

Ultrazentrifugen-Untersuchungen an
integralen Membran-Proteinen:
Neue Techniken zur Dichtekompensation von
Detergensmizellen und ihre Anwendung

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Physik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Gottfried Mayer
aus Passau

Frankfurt am Main (2002)
(D F 1)

1	EINLEITUNG	5
2	DIE UNTERSUCHUNGSOBJEKTE	7
2.1	Membranproteine: Bestandteile biologischer Membranen	7
2.2	Der bc_1 -Komplex: Ein Enzym der Atmungskette	8
2.2.1	Die Atmungskette	8
2.2.2	Der bc_1 -Komplex	9
2.3	Das Bande 3-Protein der menschlichen Erythrozytenmembran	12
2.3.1	Der menschliche Erythrozyt	12
2.3.2	Das Bande 3-Protein	15
3	ANALYTISCHE ULTRAZENTRIFUGATION	17
3.1	Prinzip, Anwendungsmöglichkeiten, Bedeutung	17
3.2	Theoretische Grundlagen	19
3.3	Apparatives	26
3.4	Durchführung von Ultrazentrifugenexperimenten	29
3.4.1	s-Läufe	29
3.4.2	Gleichgewichtsläufe	30
3.5	Auswertung	31
3.5.1	Auswertung von s-Läufen	31
3.5.2	Auswertung von Gleichgewichtsläufen	37
4	ULTRAZENTRIFUGENUNTERSUCHUNG INTEGRALER MEMBRANPROTEINE	40
4.1	Präparation	40
4.1.1	Präparationsmittel Detergens	40
4.1.2	Solubilisation und Aufreinigung	43
4.1.3	Anforderungen an das Präparat	44
4.2	Analyse	45
4.2.1	Störfaktor Detergens	45
4.2.2	Dichtekompensation	46

5	NEUE METHODEN ZUR KOMPENSATION DER SCHWIMMDICHTE VON DETERGENSMIZELLEN	48
5.1	Methoden zur Ermittlung und Herstellung von Kompensationsbedingungen	49
5.2	Dichtekompensation ausgewählter nichtionischer Detergenzien	53
5.2.1	Dichtekompensation von C ₁₂ E ₉	53
5.2.2	Dichtekompensation von rTX-100	57
5.2.3	Dichtekompensation von DDM	63
5.2.4	Dichtekompensation durch Kombination von LDAO und C ₁₂ E ₉	67
5.3	Anwendung der Kompensationsmethoden auf das „Testprotein“ Cytochrom <i>c</i>-Oxidase	71
5.3.1	Das Cytochrom <i>c</i> -Oxidase-Präparat	72
5.3.1.1	Präparation	72
5.3.1.2	Eigenschaften des Präparats	73
5.3.2	Cytochrom <i>c</i> -Oxidase als „Testprotein“	75
5.3.3	Ultrazentrifugenuntersuchung der Cytochrom <i>c</i> -Oxidase unter verschiedenen Kompensationsbedingungen	77
5.3.3.1	Ultrazentrifugenuntersuchung der Cytochrom <i>c</i> -Oxidase in Gegenwart von C ₁₂ E ₉	79
5.3.3.2	Ultrazentrifugenuntersuchung der Cytochrom <i>c</i> -Oxidase in Gegenwart von rTX-100	82
5.3.3.3	Ultrazentrifugenuntersuchung der Cytochrom <i>c</i> -Oxidase in Gegenwart von DDM	83
5.3.3.4	Ultrazentrifugenuntersuchung der Cytochrom <i>c</i> -Oxidase in Gegenwart der Detergenzmischung	87
5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich der Methoden	89
5.5	Diskussion	91
5.5.1	Kompensation niedriger bis mittlerer Detergensdichten	92
5.5.2	Kompensation hoher Detergensdichten	94
6	ANWENDUNG I: DER ASSOZIATIONSZUSTAND DES CYTOCHROM <i>bc</i>₁-KOMPLEXES VON <i>PARACOCCLUS DENITRIFICANS</i>	97
6.1	Die Präparation	98
6.1.1	Herstellung bakterieller Membranen mit hohem Cytochrom <i>bc</i> ₁ -Anteil	98
6.1.2	Solubilisation	99
6.1.3	Ionenaustauscherchromatographie	99
6.1.4	Gelfiltrationschromatographie	101
6.2	Methoden zur Qualitätskontrolle des Präparats	105
6.2.1	Gelfiltrationschromatographie	105
6.2.2	SDS-PA-Gelelektrophorese	105

6.2.3	Redox-Spektren	105
6.2.4	Aktivitätsmessungen	106
6.2.5	Analytische Ultrazentrifugation	106
6.3	Auswirkung verschiedener Detergentien auf das Präparat	107
6.3.1	C ₁₂ E ₉	107
6.3.2	Mischung aus C ₁₂ E ₉ und LDAO	109
6.3.3	DDM	110
6.4	Nativität, Stabilität, Reinheit und Einheitlichkeit des bc₁-Komplexes in 0,02% DDM	110
6.5	Das partialspezifische Volumen des bc₁-Komplexes	121
6.6	Die Untersuchung des bc₁-Komplexes unter der Bedingung der Dichtekompensation	122
6.7	Bestimmung der an den bc₁-Komplex bindenden DDM-Menge	125
6.8	Diskussion	129
7	ANWENDUNG II: DIE SELBSTASSOZIATION DES BANDE 3-PROTEINS DER MENSCHLICHEN ERYTHROZYTENMEMBRAN	131
7.1	Das Problem	131
7.2	Die Präparation des Bande 3-Proteins	132
7.2.1	Stromapräparation	133
7.2.2	Vorextraktion	134
7.2.3	Hauptextraktion	138
7.2.4	Ionenaustauscherchromatographie	139
7.2.5	Gelfiltration	141
7.2.6	Qualitätstests	141
7.3	Molmasse und partialspezifisches Volumen der Bande 3	144
7.3.1	Molmasse	144
7.3.2	Partialspezifisches Volumen	145
7.4	Die Untersuchung des Bande 3-Proteins in C₁₂E₉-Lösungen	145
7.4.1	Untersuchung ohne Dichtekompensation	145
7.4.2	Dichtekompensation mit D ₂ O	156
7.4.3	Dichtekompensation mit Saccharose	160
7.4.4	Dichtekompensation mit Glyzerin	162
7.5	Die Untersuchung des Bande 3-Proteins in rTX-100-Lösungen	176

7.6	Diskussion	180
8	ZUSAMMENFASSUNG	184
9	ANHANG	186
9.1	Anhang 1: Verzeichnis physikalischer Symbole	186
9.2	Anhang 2: Zur Dichtekompensation von DDM	187
9.2.1	Herstellung der Lösungen zur Ermittlung der Kompensationsbedingung	187
9.2.2	Überführung von Protein in den Kompensationspuffer	189
9.3	Anhang 3: Materialien und Methoden	190
9.3.1	Materialverzeichnis	190
9.3.1.1	Proteine	190
9.3.1.2	Detergenzien und Lipide	190
9.3.1.3	Weitere Chemikalien	190
9.3.1.4	Sonstige Materialien	192
9.3.2	Methodenverzeichnis	192
10	LITERATURVERZEICHNIS	194

1 Einleitung

Proteine sind die Funktionsträger des Lebens. Ihre diesbezüglichen Eigenschaften werden nicht zuletzt bestimmt bzw. gesteuert von Protein-Protein-Assoziationen, sei es innerhalb einer Spezies, sei es zwischen verschiedenen Proteinen. Eine unverzichtbare Methode, derartige Assoziationen zu untersuchen, ist die analytische Ultrazentrifugation, deren Möglichkeiten aufgrund neuer Entwicklungen bei der Datenanalyse beständig zunehmen.

Ultrazentrifuguntersuchungen von Proteinen sind allerdings nur im Falle wasserlöslicher Proteine direkt möglich. Ein großer, biochemisch sehr wesentlicher Teil der Proteine ist aber in biologische Membranen eingebettet. Um derartige Proteine, „integrale Membranproteine“, in wässrige Lösung zu bringen und somit die wesentliche Voraussetzung für analytische Ultrazentrifugation zu erfüllen, ist es nötig, die natürliche Umgebung des membranständigen Proteinteils zu ersetzen. Der Ersatz muß einerseits diese natürliche Umgebung simulieren, andererseits die Einbeziehung des Proteins in das wässrige Milieu vermitteln. Diese Doppelfunktion wird geeigneten amphiphilen Molekülen, in der Regel nichtionischen Detergenzien, übertragen.

Der Einsatz von Detergenzien eröffnet damit die Möglichkeit, integrale Membranproteine ebenso wie wasserlösliche Proteine in der Ultrazentrifuge zu studieren, allerdings um den Preis mindestens einer zusätzlichen unbekannten Größe: der Menge des an das Membranprotein gebundenen Detergens`. Um von der Kenntnis dieser Größe unabhängig zu sein, gibt es seit geraumer Zeit die Technik der „Dichtekompensation“, der Angleichung von Lösungsmitteldichte und Detergensdichte, wodurch das Detergens im Zentrifugalfeld „unsichtbar“ wird. Die bis dato gegebenen Möglichkeiten dieser Technik sind allerdings begrenzt, es werden nur Detergenzien mit Dichten nahe der Dichte von Wasser erfaßt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich in einem ersten Teil mit der Erweiterung der Möglichkeiten der Dichtekompensation: Es werden neue Dichtekompensationsverfahren etabliert. Im zweiten und dritten Teil dieser Arbeit werden unter Zuhilfenahme der neuen Dichtekompensationsverfahren biochemisch/ medizinisch sehr bedeutsame Membranproteine, der Cytochrom bc_1 -Komplex und das Bande 3-Protein, untersucht. Im Falle des bc_1 -Komplexes, eines Enzyms der Atmungskette – beteiligt an der Umwandlung von Energie aus Redox-Prozessen in eine elektrochemische Potentialdifferenz –, wird das Selbstassoziationsverhalten des Proteins analysiert, um die These von der funktionellen Notwendigkeit eines dimeren Zustands zu prüfen. Im Falle der Bande 3, eines Multifunktionsproteins aus der Erythrozytenmembran – verantwortlich für den Anionenaustausch, mitverantwortlich für die mechanischen Eigenschaften der Blutzelle –, soll nicht nur die für die verschiedenen Funktionen bedeutsame Art der Selbstassoziation geklärt werden. Es wird auch nach dem Grund für die diesbezügliche Uneinigkeit in der Literatur gefragt.

2 Die Untersuchungsobjekte

2.1 *Membranproteine: Bestandteile biologischer Membranen*

Biologische Membranen sind proteinhaltige Lipiddoppelschichten. Sie definieren – als Plasmamembranen oder interne Membranen eukaryontischer Zellen – Zellen oder Zellorganellen, indem sie biologische Funktionseinheiten voneinander abgrenzen. Sie sind der Ort diverser biochemischer Vorgänge, wobei für die verschiedenen Funktionen im wesentlichen die Proteine verantwortlich zeichnen. [46] [134] [157] ¹

Alle biologischen Membranen weisen das gleiche Strukturprinzip auf: Als Grundbausteine fungieren Lipide wie Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Sphingomyelin, amphiphile Moleküle (polare Moleküle mit einer hydrophilen und einer lipophilen/ hydrophoben Domäne), die sich in wäßrigem Milieu zur in sich geschlossenen Doppelschicht (Doppelschicht: „Bilayer“) formen. Bei entsprechender Zusammensetzung und Temperatur verhalten sich derartige Lipiddoppelschichten wie zweidimensionale Flüssigkeiten, sie dienen als „Lösungsmittel“ für Proteine (integrale Membranproteine) [128].

Neben den integralen Membranproteinen, die mit Bereichen mit hydrophober Oberfläche in die Lipiddoppelschicht eintauchen bzw. sie durchdringen (Transmembranproteine), gibt es Proteine, die an den Membranoberflächen oder an integralen Membranproteinen gebunden sind (periphere Membranproteine) [128]. Insgesamt bestehen biologische Membranen etwa zur Hälfte aus Protein (in der inneren Mitochondrienmembran beträgt der Proteinanteil sogar ca. 75%). Die diversen Membranproteine fungieren als Rezeptoren, sind katalytisch wirksam, sorgen als aktive oder passive Transportsysteme für einen geregelten Material- und Informationsfluß durch die Membran, stabilisieren selbige, dienen als Identitäts- oder Adhäsionsmoleküle u.a.m. Dies begründet ihre Bedeutung z.B. in der Medizin: Mehr als zwei Drittel aller heute zugelassenen Medikamente wirken an Membranproteinen.

¹ Literaturangaben am Ende eines Absatzes nach dem Punkt beziehen sich auf den gesamten Absatz.

2.2 Der bc_1 -Komplex: Ein Enzym der Atmungskette

2.2.1 Die Atmungskette

Tiere sowie die meisten Pilze und Bakterien gewinnen ihre Energie aus dem schrittweisen und sehr genau gesteuerten „Verbrennen“ von Nahrung (Kohlenhydrate, Fette): Sie wird in der Glykolyse und im Zitronensäurezyklus aufgeschlossen, wobei biologisch gebundener Wasserstoff, hauptsächlich in Form von NADH, gebildet wird. Diese Reduktionsäquivalente werden in der sogenannten Atmungskette, dem letzten Schritt im abbauenden Stoffwechsel (Katabolismus), der bei Eukaryonten in der inneren Mitochondrienmembran, bei Bakterien in der Plasmamembran lokalisiert ist, von Sauerstoff oxydiert (wodurch Wasser entsteht). Die Energie dieser Reaktion wird gespeichert in Form eines elektrochemischen Membranpotentials, das darauf beruht, daß diesseits und jenseits der Membran sowohl Ladungsträger als auch chemische Bestandteile ungleich verteilt sind. Das Membranpotential treibt eine Reihe von Zellvorgängen, z.B. die Geißelbewegung in Bakterien, den Transport von Substanzen über eine Membran sowie die Synthese von ATP, der universellen Energie-„Währung“ der Zelle, durch die ATP-Synthase. [134] [157]

Die Atmungskette ist der energetisch ertragreichste Schritt im gesamten Katabolismus. Die Energie der „Knallgasreaktion“ wird dabei in kontrollierten Teilschritten frei: Die Elektronen werden kaskadenartig über vier membrangebundene Enzyme (Komplex I-IV) und die Hilfs-substrate Coenzym Q (Ubichinon) und Cytochrom *c* zum Sauerstoff geleitet. Die abschließende Reaktion mit Sauerstoff ist irreversibel, womit ein stetiger Fluß durch das Gesamtsystem gewährleistet ist. Die Einzelschritte sehen folgendermaßen aus: Die NADH-Ubichinon-Reduktase, der Komplex I der Atmungskette, vermittelt die Oxidation von NADH durch Coenzym Q (dies ist ein aufgrund einer Isoprenseitenkette sehr lipophiles Molekül mit großem Diffusionskoeffizienten in der Membran, in der es – verglichen mit anderen Bestandteilen der Atmungskette – in etwa 10-15-fachem Überschuß vorhanden ist) und nutzt die dabei freiwerdende Energie zum gerichteten Verlagern von Protonen über die Membran, wirkt also als „Protonenpumpe“. Außerdem wird reduziertes Coenzym Q (Ubihydrochinon) durch Succinat-Oxidation gebildet (via Succinat-Ubichinon-Reduktase – Komplex II –, die nur als Dehydrogenase, nicht aber als Protonenpumpe wirkt). Ubihydrochinon wird reoxidiert von Ubihydrochinon-Cytochrom *c*-Reduktase, auch Komplex III oder (Cytochrom) bc_1 -Komplex genannt. Der bc_1 -Komplex seinerseits reduziert Cytochrom *c*, ein an der Außenseite der Membran lokalisiertes peripheres Membranprotein. Die Ubihydrochinon-Cytochrom *c*-Redoxkette ist über einen „Q-Zyklus“ genannten Mechanismus an die energieaufwendige

Translokation von Protonen über die Membran gekoppelt. Ebenfalls als Protonenpumpe fungiert Cytochrom *c*-Oxidase, der die Atmungskette abschließende Komplex IV, der Cytochrom *c* reoxidiert und die Elektronen auf O₂ überträgt (unter Bildung von H₂O). Wird der im Verlauf der gesamten Atmungskette entstandene Protonengradient zur ATP-Synthese (aus ADP und anorganischem Posphat) genutzt, entstehen daraus insgesamt 34 Moleküle ATP pro Molekül Glucose (als Ausgangspunkt des Katabolismus). [134] [146] [157]

Ein Blick auf die einschlägige Literatur zeigt, daß sich das Studium der Atmungskette und ihrer Glieder nicht auf Eukaryonten beschränkt: Einen breiten Raum nehmen Untersuchungen an respiratorisch aktiven Bakterien ein, da hier die Komplexe I-IV deutlich einfacher strukturiert sind als in Mitochondrien; in der Regel bestehen sie ausschließlich aus den für die Atmungskette funktionell notwendigen Untereinheiten. Somit nimmt die bakterielle Atmungskette den Rang eines Modells für die Atmungskette generell ein. [146]

Ein etablierter Ausgangspunkt der Atmungsketten-Forschung ist *Paracoccus denitrificans*, ein respiratorisch vielseitiges und damit sehr anpassungsfähiges Bodenbakterium (bei O₂-Mangel existieren alternative Elektronenpfade und -akzeptoren). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Enzyme aus *Paracoccus denitrificans* untersucht: die integralen Membranproteine **Cytochrom *c*-Oxidase** und **Cytochrom *bc*₁-Komplex**, ersteres als Modell zur Etablierung neuer Varianten der Ultrazentrifugenanalyse integraler Membranproteine, letzteres als Untersuchungsobjekt unter Nutzung einer dieser Varianten.

2.2.2 Der *bc*₁-Komplex

Alle Cytochrom *bc*₁-Komplexe enthalten drei essentielle katalytische Untereinheiten:

- Cytochrom *b* mit zwei Häm *b*-Gruppen unterschiedlichen Redoxpotentials (*b*_L und *b*_H),
- Cytochrom *c*₁ mit einem kovalent gebundenen Häm *c* und das sogenannte
- Rieske-Eisen-Schwefel-Protein (ISP) mit einem [2Fe•2S]-Zentrum.

Die mitochondrialen Komplexe enthalten bis zu 8 zusätzliche Polypeptide, die keine Redox-Funktion erfüllen. Der *bc*₁-Komplex von *Paracoccus denitrificans* dagegen besteht ausschließlich aus den drei funktionell obligatorischen Proteinuntereinheiten [67] [172]. Hinsichtlich der Aktivität beim Elektronentransfer und beim Wechsel der Energieform sowie der Empfindlichkeit gegenüber Elektronentransfer-Inhibitoren unterscheidet sich der bakterielle Komplex nicht von seinen mitochondrialen Verwandten. [24] [45] [67] [146] [147] [171]

Für den *bc*₁-Komplex-spezifischen Mechanismus der mit dem Elektronentransfer gekoppelten Protonentranslokation über die Membran gilt der (modifizierte) Q-Zyklus als generell akzep-

tiertes Modell [8] [13] [171] (wenngleich es auch Kritiker dieses Modells gibt [79] [102]). Der Q-Zyklus sieht in groben Zügen wie folgt aus (zum besseren Überblick s. *Abbildung 2.1*): Der bc_1 -Komplex hat zwei Bindungs- und Reaktionsstellen für Coenzym Q (Q_o und Q_i). Q_o ist zur Außenseite, Q_i zur Innenseite der Membran orientiert (die Außenseite ist positiv, die Innenseite negativ geladen). An Q_o findet die Oxidation (der Entzug von Wasserstoff) von Ubihydrochinon statt, ein Vorgang, der eine hohe Aktivierungsenergie (bzw. freie Enthalpie) erfordert: Es wird ein energiereicher Übergangskomplex aus dem Enzym an der Stelle Q_o , dem Ubihydrochinon und dem Eisen-Schwefel-Protein (in oxidierten Form vorliegend) gebildet [27] [55] (die Details der Ubihydrochinon-Oxidation sind noch umstritten [14]; [72]; [23] [26] [27] [55]). Während die beiden von Coenzym Q stammenden Protonen nach außen transportiert werden, gehen die beiden Elektronen getrennte Wege: Ein Elektron wird über das $[2Fe\cdot 2S]$ -Zentrum zum Cytochrom c_1 transferiert, von dem es auf das Cytochrom c übertragen wird („Hochpotential-Kette“); das andere Elektron wandert über Häm b_L und Häm b_H zum an Q_i gebundenen Ubichinon, das dabei unter Aufnahme eines Protons aus dem Zell- bzw. Organellinnenraum zu Ubisemichinon reduziert wird („Niederpotential-Kette“). Um den Q-Zyklus abzuschließen, muß ein weiteres Ubihydrochinon oxidiert werden, wobei sich der Mechanismus wiederholt, mit einem Unterschied: An Q_i wird nicht Ubichinon, sondern – unter Aufnahme eines Protons – Ubisemichinon reduziert, welches von seiner Bildung bis zu seiner Reduktion an Q_i stabilisiert wird. Damit werden im Verlauf eines kompletten Q-Zyklus einerseits zwei Ubihydrochinone zu Ubichinon oxidiert, andererseits wird ein Ubihydrochinon zurückgewonnen. Dabei werden zwei Cytochrom c reduziert, zwei Protonen aus der negativ geladenen Membranseite verbraucht und vier Protonen auf die positiv geladene Seite befördert.

Die Verzweigung des Elektronenflusses bei der Oxidation von Ubihydrochinon ist die entscheidende Teilreaktion des Q-Zyklus. Sie scheint als konzertierte Aktion am Ubihydrochinon-Oxidationszentrum vonstatten zu gehen. Dieser Anschein wird einerseits dadurch erweckt, daß die Bildung des energiereichen Übergangskomplexes der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, andererseits dadurch, daß ein Ubisemichinon, da instabil, an Q_o schwer nachweisbar ist [27] [64].

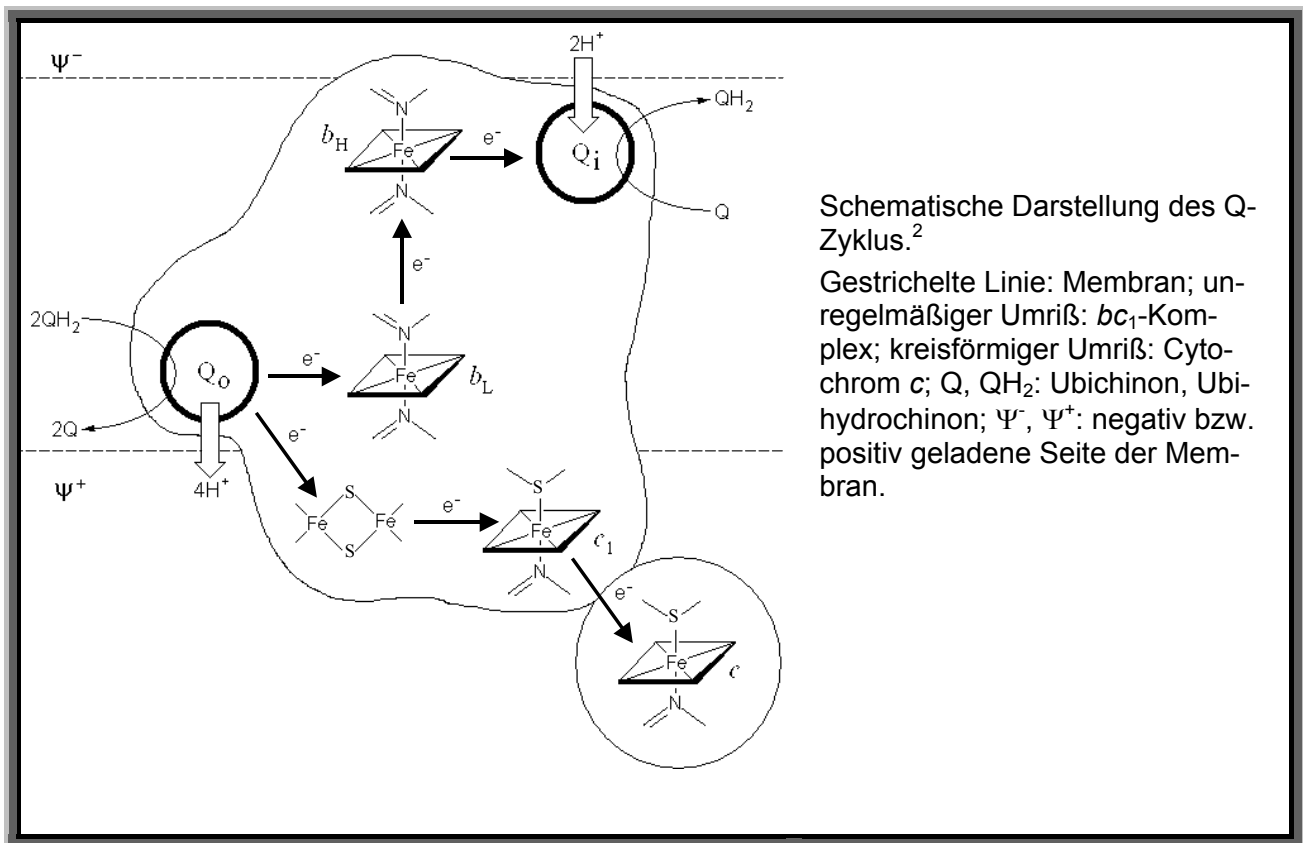


Abbildung 2.1

Während die Niederpotential-Kette die freie Beweglichkeit von Coenzym Q in der Membran und damit zwischen Q_0 und Q_i zur Voraussetzung hat, legt ein Funktionieren der Hochpotential-Kette eine gewisse Beweglichkeit des Eisen-Schwefel-Proteins nahe, da der Abstand zwischen Q_0 auf Cytochrom b und der Reaktionsdomäne auf Cytochrom c_1 für einen (schnellen) Elektronentransfer zu groß ist. Nun liegt inzwischen von einigen mitochondrialen bc_1 -Komplexen die Kristallstruktur vor [57] [58] [170] [175], wobei in verschiedenen Arbeiten die Kristalle unter verschiedenen Bedingungen präpariert wurden. Ein Vergleich der verschiedenen Strukturen verweist darauf, daß die Position der externen Domäne des Eisen-Schwefel-Proteins abhängig von den gewählten Bedingungen ist, d.h. daß die Domäne in der Tat eine gewisse Rotationsbeweglichkeit besitzt. Nimmt man die verschiedenen Kristallstrukturen zusammen, ergibt sich das Bild, daß die Eisen-Schwefel-Untereinheit wie der Schaufelarm eines Baggers zwischen den Reaktionsdomänen der Cytochrome b und c_1 pendelt und Elektronen entlang des Redoxpotentials „schaufelt“ [25] [28] [57] [58] [169] [175].

² Aus URL: <http://bmbgsi11.leeds.ac.uk/promise/CYTBC1.html> [Stand 03-2002] (verändert).

Die Kristallstrukturen ergaben darüber hinaus, daß der mitochondriale bc_1 -Komplex offenbar als (Homo-) Dimer vorliegt, wobei die Eisen-Schwefel-Domäne nicht mit den Cytochromen b und c_1 des eigenen Protomeren wechselwirkt, sondern mit denjenigen des anderen. Ob dieser Dimer-Mechanismus generell für bc_1 -Komplexe gilt, oder – aus sterischen Gründen? – lediglich von den vergleichsweise voluminösen mitochondrialen Komplexen genutzt wird, ist bis dato ungeklärt. Selbst die Frage nach dem oligomeren Zustand prokaryontischer bc_1 -Komplexe ist noch offen; ihr widmet sich ein Teil der vorliegenden Arbeit.

2.3 Das Bande 3-Protein der menschlichen Erythrozytenmembran

2.3.1 Der menschliche Erythrozyt

Der menschliche Erythrozyt, die rote Blutzelle, wird im roten Knochenmark gebildet und verliert während seiner Reifung sämtliche Organellen einschließlich Zellkern. Außerdem ist das Zytoskelett der reifen Zelle auf ein 2-dimensionales Netz reduziert, das an der zytoplasmatischen Oberfläche der Plasmamembran haftet und diese stabilisiert. Damit stellt der reife menschliche Erythrozyt im Prinzip eine – mit einer hauptsächlich Hämoglobin enthaltenden Proteinlösung gefüllte – Plasmamembranblase mit hoher mechanischer Belastbarkeit dar, die keine weiteren Membranen beherbergt. Der reife Erythrozyt gelangt in den Blutkreislauf, hat eine Lebenserwartung von etwa 120 Tagen und wird schließlich im mononukleär-phagozytierenden System abgebaut.

Die Hauptaufgabe des Erythrozyten ist der Transport von Sauerstoff und Kohlendioxid im Blut: Sauerstoff, der aus der Lunge in das Blut und in die Blutzellen diffundiert, wird von Hämoglobin gebunden und mit der Blutzelle an den Ort des Sauerstoffbedarfs transportiert. Umgekehrt wird das kaum lösliche Kohlendioxyd, das als Endprodukt des Energiestoffwechsels aus dem Gewebe in die Kapillaren diffundiert, im Erythrozyt angereichert, vornehmlich via Carboanhydrase-katalysierter Umwandlung in das leichtlösliche Hydrogencarbonat, wobei Hämoglobin die entstehenden Protonen aufnimmt (unter Sauerstoffabgabe). Das als Hydrogencarbonat im Erythrozyten angereicherte Kohlendioxyd wird durch das Transmembranprotein „Bande 3“ gegen Chlorid aus der Zelle befördert [91] und so auf das gesamte Blut – Plasma plus Zytoplasma – verteilt, worin es in großer Menge zur Lunge weitergeleitet wird. In der Lunge werden aufgrund entsprechender Partialdruckgradienten von Sauerstoff bzw. Kohlendioxyd einerseits Protonen am Hämoglobin von Sauerstoff verdrängt, wodurch aus Hydrogencarbonat Kohlendioxyd rückgebildet wird (Carboanhydrase-katalysiert), welches andererseits aus dem Erythrozyten diffundiert und letztlich ausgeatmet wird.

Der entstehende Konzentrationsgradient von Hydrogencarbonat treibt dessen Rücktransport – erneut durch das Bande 3-Protein im Austausch gegen Chlorid – aus dem Plasma in die Zelle, in der die Rückverwandlung zu Kohlendioxid stattfindet. [40]

Die mechanischen Eigenschaften sowie die Form des (gesunden) Erythrozyten, die wesentlich auf der von Bande 3 und Ankyrin vermittelten Bindung des Zytoskeletts an die Lipiddoppelschicht beruhen, sind an die Anforderungen, die seine zentrale Funktion an ihn stellt, angepaßt: Seine bikonkave Form sorgt dafür, daß die Diffusionswege für die Gasmoleküle relativ kurz sind; er ist aufgrund seiner hohen Verformbarkeit in der Lage, durch Kapillaren zu wandern, deren Durchmesser kleiner ist als sein eigener; weiterhin senkt das flüssigkeitsähnliche Verhalten der Plasmamembran die Viskosität des Blutes; schließlich ist die mechanische Belastbarkeit der Membran ein Garant dafür, daß die rote Blutzelle die hohen Scherkräfte, die beim Fluß durch die Gefäße wirken, für längere Zeit schadlos übersteht.

Die Membran des Erythrozyten, deren Innenseite in *Abbildung 2.2* skizziert ist, besteht aus ca. 49% Protein, ca. 43% Lipid und ca. 8% Kohlenhydrat [132]. Letzteres ist Bestandteil von Glykolipiden und Glykoproteinen und befindet sich an der äußeren Oberfläche der Membran, wo es eine „filzige“ Hülle bildet und zahlreiche Blutgruppenderminanten liefert [157]. Der Proteinanteil setzt sich aus etwa 50 verschiedenen Proteinen zusammen. Zu den integralen Membranproteinen zählen der Anionenaustauscher Bande 3 sowie die Glykophorine, zu den peripheren die Elemente des Zytoskeletts (Hauptkomponente: Spektrin) sowie die Bindeglieder zwischen Membran und Zytoskelett (wichtigster Vertreter: Ankyrin; verknüpft Bande 3 mit Spektrin). Eine Auftrennung der Proteine durch SDS-Gelelektrophorese liefert – je nach Färbemethode – eine Reihe von Banden, nach denen die Proteine benannt sind (s. *Abbildung 2.3*) [38] [132].

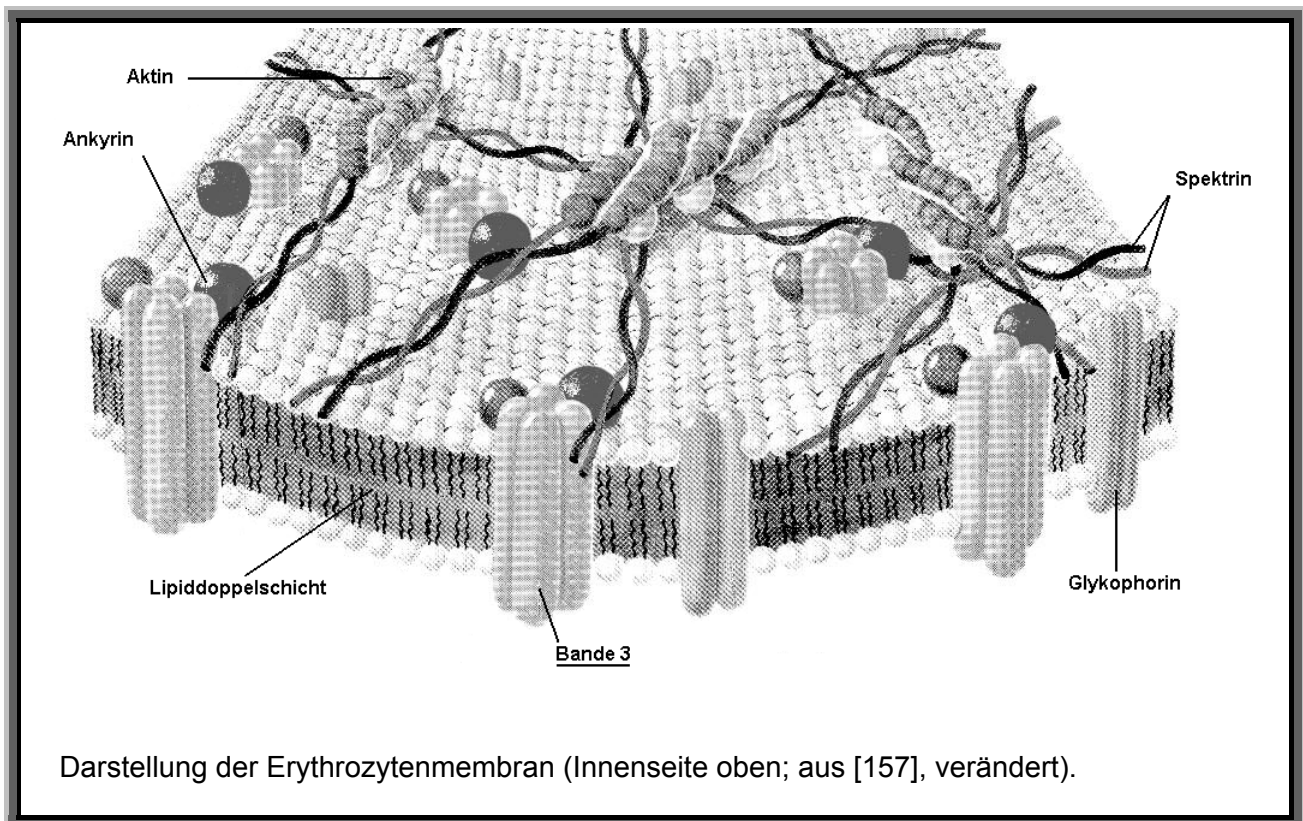


Abbildung 2.2

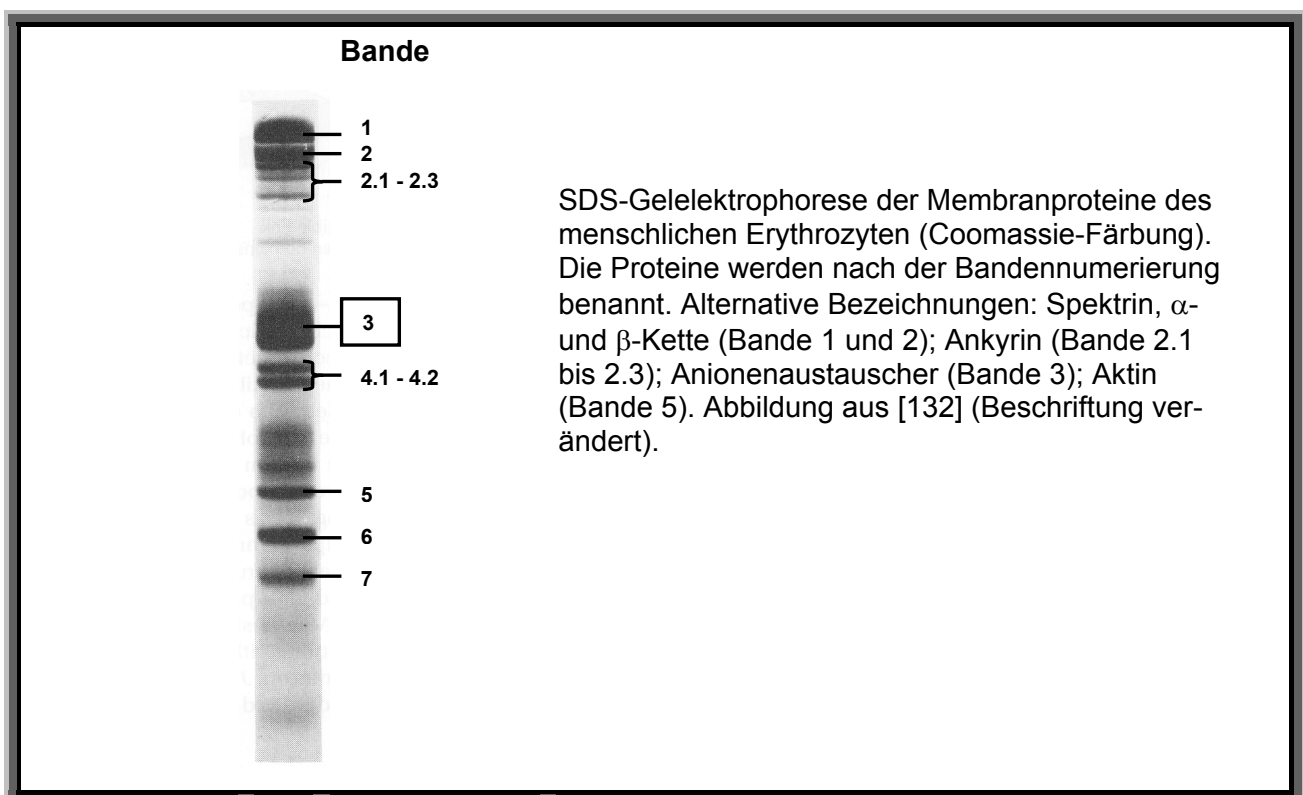


Abbildung 2.3

Für die Wissenschaft ist der Erythrozyt nicht nur wegen seiner biologischen Funktion von Bedeutung: Seine Membran bzw. seine Membranproteine dienen als Modell für Plasmamembranen bzw. für Proteine der entsprechenden Familie. Gründe dafür sind neben der leichten Verfügbarkeit der roten Blutzellen vor allem ihre einfache Zusammensetzung und Struktur, wodurch das System „Erythrozyt“ sowie seine Bestandteile relativ einfach zu untersuchen sind.

2.3.2 Das Bande 3-Protein

Mit ca. $1,2 \cdot 10^6$ Exemplaren pro Zelle stellt das Bande 3-Protein, ein transmembranes Glykoprotein, etwa 25% (w/w) der Membranproteine des Erythrozyten [131]. Es zeichnet sich durch eine Reihe völlig verschiedener Funktionen aus, deren wichtigste der Hydrogencarbonat-Chlorid-Austausch und die Lipiddoppelschicht-Zytoskelett-Verknüpfung sind. Träger dieser zahlreichen Funktionen sind im Wesentlichen die amino-terminale zytoplasmatische und die membranständige Domäne, zwei Domänen, die strukturell getrennt und funktionell (weitgehend) unabhängig sind [4]. Ein kurzer, carboxyl-terminaler Bereich komplettiert das Protein [78]. Übersichtsartikel: [63] [74] [91] [97] [141]

Die glykosylierte transmembrane Domäne durchdringt die Lipiddoppelschicht 12- oder 14-fach [63] [97]. Sie bildet für die meisten einwertigen Anionen eine Passage durch die Membran – gemäß [71] innerhalb eines Monomers, gemäß [163] nach Assoziation zu einem Dimeren – und zeichnet so für den physiologisch bedeutsamen Austausch zwischen Hydrogencarbonat und Chlorid verantwortlich. Zweiwertige anorganische Anionen werden ebenfalls transportiert (im Kotransport mit einem Proton), allerdings beträchtlich langsamer als einwertige anorganische (was zur Messung des Transportverhaltens genutzt wird). Der Anionentransport ist elektroneutral und passiv; er findet als obligatorischer eins-gegen-eins Austausch (Antiport) statt. [61] [63] [91] [141]

An die membranständige Domäne schließt sich über ein flexibles „Gelenk“ die hydrophile zytoplasmatische Domäne an, die langgestreckt ins Zytosol ragt [74]. Sie kann abhängig vom pH-Wert in drei verschiedenen Konformationszuständen vorliegen, was offenbar auf eine flexible Stelle im mittleren Bereich zurückzuführen ist [74]. Sie ist der Bindungsort sowohl für zytosolische Proteine, wie Hämoglobin [123], Aldolase [56], Phosphofructokinase [54] oder Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase [161], als auch für die Zytoskelettanker Ankyrin [30] [82] [84] [87] [93] [166] und Bande 4.1 [160]. Für die meisten dieser Bindungen – die wohl auf der Tetramerisierung der Bande 3 beruhen [115] [160] [161] – konnte eine regulatorische Funktion nachgewiesen werden. So wird die Aktivität der glykolytischen Enzyme Aldolase, Phosphofructokinase und Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

durch Bindung an Bande 3 beeinflusst [73]. Ein weiteres Beispiel liefert das Bande 4.1-Protein, das die Bande 3-Ankyrin-Wechselwirkung modulieren soll [1].

Der carboxyl-terminale „Schwanz“ bindet Carboanhydrase II [154]. Eine weitere Funktion dieser Domäne ist bis dato nicht bekannt.

Neben den bisher genannten Funktionen der Bande 3 sei noch erwähnt, daß ihre Glykosylierung an der extrazellulären Seite zur Blutgruppenspezifität beiträgt [32] [148]. Außerdem ist das Protein an der Erkennung alter oder beschädigter Erythrozyten durch Makrophagen beteiligt [149]. Schließlich sei auf die Wechselwirkung der Bande 3 mit Glykophorin A hingewiesen, welche die Translokation der Bande 3 befördert [48].

Die vielfältigen Einflüsse der Bande 3 auf die Verhältnisse im und um den Erythrozyten rücken die strukturellen Determinanten dieser Einflüsse und damit die Bande 3-Struktur in den Blickpunkt. Dabei ist die **Primärstruktur** und die Zuordnung der Aminosäuren zu den Domänen bekannt [78] [140]. Über **Sekundär-** und **Tertiärstruktur** liegen ebenfalls detaillierte Informationen vor. So wurden die beiden Hauptdomänen – von der jeweils anderen getrennt – kristallisiert [162] [163] [174]; die Struktur der Transmembrandomäne liegt mit einer Auflösung von 20 Å, diejenige der zytoplasmatischen Domäne mit einer Auflösung von 2,6 Å vor. Diesen Strukturen ist zu entnehmen, daß das Bande 3-Protein insgesamt ein langgestrecktes Makromolekül darstellt (welches überdies sehr flexibel ist, vgl. [164]), dessen Hauptdomänen für sich zu Dimeren assoziieren. Im Falle der zytoplasmatischen Domäne ist aufgrund der hohen Auflösung darüber hinaus neben den Bindungsplätzen einiger Bande 3-Bindungspartner das Ineinandergreifen von „Dimerisierungsarmen“ zu erkennen [174]. Über die **Quartärstruktur** der **vollständigen Bande 3** herrscht allerdings keine einheitliche Meinung (womit auch die diesbezüglichen funktionellen Implikationen umstritten sind): Neben dem zweifelsohne vorhandenen Dimeren [16] [62] [173] (welches durch Quervernetzung der Protomere über Cysteine der Bande 3 artifiziell stabilisiert werden kann) werden weitere Oligomere diskutiert – als stabile Komponenten [93] [97] oder als Bestandteile eines Assoziationsgleichgewichts [90] [104] [142]. Ein Teil der vorliegenden Arbeit widmet sich der Klärung dieser Frage.

Das Bande 3-Protein des menschlichen Erythrozyten ist einerseits medizinisch bedeutsam: Einige Krankheiten beruhen auf Defekten an diesem Protein [92] [101]. Andererseits ist es als Mitglied einer Familie von Anionenaustauschern, die in vielen Zellen vorhanden sind und dort den intrazellulären pH-Wert oder Ionengradienten regulieren, als Modellsystem interessant [17].

3 Analytische Ultrazentrifugation

3.1 Prinzip, Anwendungsmöglichkeiten, Bedeutung

Um kolloidal gelöste Makromoleküle wie Proteine auf ihr Sedimentationsverhalten hin zu untersuchen, müssen sie einem verglichen mit dem Gravitationsfeld der Erde starken Kraftfeld ausgesetzt werden. Dies leistet die Ultrazentrifuge, ein Gerät, in dem derartige Felder erzeugt, dauerhaft aufrechterhalten und in ihrer Stärke variiert werden können. Die Zentrifugalkraft, $F = m\omega^2 r$, bewirkt einen Massentransport, der für präparative und analytische Zwecke genutzt werden kann.³ In präparativen Ultrazentrifugen wird unterschiedliches Sedimentationsverhalten verschiedener Makromoleküle zu deren Trennung benutzt, häufig in Gegenwart eines Dichtegradienten. Die analytische Ultrazentrifuge ist mit einem optischen System ausgestattet (in der Regel Absorptions- und/ oder Rayleigh-Interferenz-Optik, seltener Fluoreszenz- oder Schlieren-Optik), womit sie die Beobachtung von Partikeln im Zentrifugalfeld ermöglicht. Hierbei gibt es zwei bedeutende, prinzipiell verschiedene Zugänge zu Meßgrößen des betrachteten Systems:

- Im **Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment** (s-Lauf) wird der Zeitverlauf der Sedimentation einer Probe beobachtet. Der s-Lauf wird in der Regel bei hohen Winkelgeschwindigkeiten (Rotordrehzahlen) durchgeführt, um die Überlagerung der Sedimentation durch Diffusion zu minimieren. Als Maß für das Sedimentationsverhalten einer Partikel-sorten dient der Sedimentationskoeffizient oder „s-Wert“ (die auf die Radialbeschleunigung bezogene Sedimentationsgeschwindigkeit; s.u.).
- Im **Sedimentationsgleichgewichtsexperiment** (Gleichgewichtslauf) mißt man das zeitlich konstante Ergebnis des Massentransports, welches vorliegt, wenn sich der vom Kraftfeld erzeugte Massenfluß und der aufgrund von Diffusion entlang des Konzentrationsgradienten auftretende Fluß überall aufheben. Zur Herstellung dieses Sedimentationsgleichgewichts werden deutlich niedrigere Rotordrehzahlen gewählt als in s-Läufen (bei gegebener Probe), da im Hinblick auf den Informationsgehalt des Resultats die Einflüsse von Sedimentation und Diffusion vergleichbar sein müssen.

³ Symbole physikalischer Größen s. *Anhang 1*

Mit Hilfe der beiden analytischen Ansätze werden einige Meßgrößen unmittelbar zugänglich: der Sedimentationskoeffizient s , der Diffusionskoeffizient D bzw. der Reibungskoeffizient f (welche von Form und Flexibilität des Partikels abhängen) und die Molmasse M bzw. die effektive Molmasse M_{eff} . Dabei können die dynamischen Parameter s , D und f nur über s -Läufe ermittelt werden, da sie im Sedimentationsgleichgewicht eliminiert sind. Bezüglich M bzw. M_{eff} ist deshalb der Gleichgewichtslauf die Methode der Wahl.

Über die direkt meßbaren Größen hinaus kann man mit geeigneter Datenanalyse aus analytischer Ultrazentrifugation eine Reihe weiterer Informationen gewinnen, insbesondere über assoziierende Systeme: In einfachen Fällen lassen sich Assoziationskonstanten bestimmen oder durch Variation von Temperatur, Ionenstärke oder pH-Wert Rückschlüsse auf entropische und enthalphische Bindungsanteile bzw. auf die Bindungsart (z.B. Ionenbindung, hydrophobe Wechselwirkung) ziehen. Von großem Interesse ist die Identifikation der verschiedenen Oligomere eines reversibel selbstassoziierenden Systems. Ebenso bedeutungsvoll ist die Analyse von stabilen oder instabilen heterogenen Assoziationen (z.B. zwischen Membranproteinen), vor allem bezüglich ihrer Stoichiometrie. Überblick: [96] oder [117]

Zur Untersuchung (selbst-) assoziierender Systeme bedient man sich sowohl der Sedimentationsgeschwindigkeits- als auch der Sedimentationsgleichgewichtsanalyse. Dabei hat erstere in letzter Zeit an Bedeutung gewonnen: Dank neuer Datenanalysemethoden kann aus einem Sedimentationsverlauf eine s -Wert-Verteilung ($c(s)$ -Verteilung) mit hoher Auflösung berechnet werden, woraus sich detaillierte Informationen über die Zusammensetzung der Probe gewinnen lassen [127]. Allerdings sind diese Informationen – ohne entsprechendes Zusatzwissen – nur qualitativer Natur: Abgesehen von systematischen Interpretationsfehlern im Falle von in schnellem Assoziationsgleichgewicht befindlichen Probenbestandteilen ist eine $c(s)$ -Verteilung nur dann eindeutig einer Molmassenverteilung zuzuordnen, wenn – neben der Dichte ρ und der Viskosität η des Probenpuffers – \bar{v} sowie f bzw. f/f_0 der sedimentierenden Bestandteile bekannt sind (\bar{v} : partialspezifisches Volumen; f/f_0 : relativer Reibungskoeffizient). Dies trifft im Falle des (relativen) Reibungskoeffizienten üblicherweise nicht zu, jedoch kann man eine $c(s)$ -Verteilung häufig bezüglich der Molmasse „eichen“, indem die der $c(s)$ -Verteilung zugrundeliegende Probe einer Sedimentationsgleichgewichtsanalyse unterzogen wird.

Die in der Sedimentationsgleichgewichtsanalyse steckenden Möglichkeiten bei der Untersuchung assoziierender Systeme haben entscheidend zur Renaissance der analytischen Ultrazentrifuge beigetragen: Der Gleichgewichtslauf ist bis heute die einzige Technik zur Beobach-

tung biochemischer Assoziations-Dissoziationssysteme im chemischen und thermodynamischen Gleichgewicht. Dabei erstreckt sich der erfaßbare Molmassenbereich von wenigen Tausend bis einigen Millionen Da (Dalton), woraus sich auch Betätigungsfelder im Bereich der supra- und makromolekularen Chemie ergeben (s. z.B. [119]).

Für einen zusätzlichen, erheblichen Bedeutungszuwachs der analytischen Ultrazentrifugation dürften die neuen Möglichkeiten bei der s-Lauf-Analyse sorgen, nicht nur auf dem Gebiet der Biochemie: Die Größenverteilungsanalyse durch c(s)-Analyse sowie verwandte Methoden [122], gleichermaßen für diskrete wie für kontinuierliche Massenverteilungen geeignet, erobert sich gegenwärtig ihren Platz auf dem weiten Feld der Nanotechnologie (s. z.B. [158]).

3.2 Theoretische Grundlagen

Zur theoretischen Beschreibung des Verhaltens von gelösten Makromolekülen (bzw. kolloidalen Aggregaten wie Mizellen) in der analytischen Ultrazentrifuge wird von einer sektorförmigen Kammer ausgegangen, die die Probe enthält (s. *Abbildung 3.1*). Die Kammer rotiert mit konstanter Winkelgeschwindigkeit um eine feste Drehachse. Der Sektorform, die dafür sorgt, daß keine Konvektion auftritt, wenn ein Massentransport in der Kammer stattfindet, wird zweckmäßigerweise durch die Einführung von Zylinderkoordinaten (r, φ, z) Rechnung getragen. In *Anhang 1* sind die verwendeten Symbole definiert.

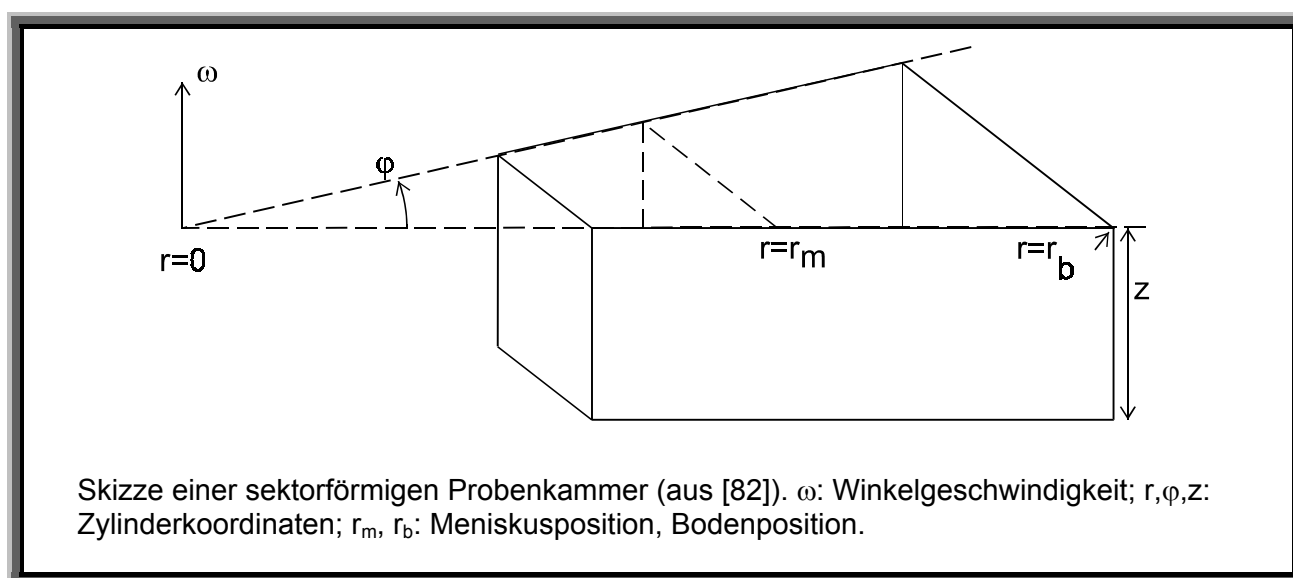


Abbildung 3.1

Eine strenge Behandlung der vorliegenden Fragestellungen erfolgt mit den Mitteln der Nichtgleichgewichtsthermodynamik [15] [41]. Der Stofftransport durch eine definierte Fläche innerhalb eines gegebenen Zeitintervalls wird als Fluß beschrieben, der als Wirkung generalisierter Kräfte zustandekommt. Bezeichnet man das Lösungsmittel als Komponente 1 und die näher betrachtete gelöste Substanz als Komponente 2, dann gilt für deren Fluß in einem N-Komponentensystem

$$\vec{J}_2 = \sum_{i=1}^N L_{2i} \vec{X}_i \quad \text{Gleichung 01}$$

Die Gleichung berücksichtigt, daß Kräfte, die unmittelbar auf eine Komponente einwirken, darüber auch auf andere Komponenten Einfluß nehmen. So ist der Transport eines Partikels immer mit einem kompensatorischen Fluß der restlichen Lösung in die entgegengesetzte Richtung verbunden. *Gleichung 01* läßt sich dementsprechend um den ersten Summanden vereinfachen, wenn man ein Bezugssystem wählt, das sich mit dem Lösungsmittel bewegt. In der folgenden Ableitung wird aber von ideal verdünnten Lösungen ausgegangen, womit derartige Schwierigkeiten entfallen. Da in der vorliegenden Arbeit sehr verdünnte Proteinlösungen untersucht werden, ist diese Einschränkung auch praktisch gerechtfertigt (vgl. [34]).

Beschränkt man sich – zunächst – auf die Betrachtung eines Zweikomponentensystems mit einer ideal verdünnten Komponente 2, gelöst in Komponente 1 (die in der vorliegenden Arbeit verwendeten „Lösungsmittel“ sind strenggenommen Mehrkomponentensysteme, die hier näherungsweise zu einer Komponente zusammengefaßt werden), vereinfacht sich nach dem Gesagten *Gleichung 01* zu

$$\vec{J}_2 = L_{22} \vec{X}_2 \quad \text{Gleichung 02}$$

Eine generalisierte Kraft (bzw. der negative Gradient eines Potentials) kann von außen einwirken oder dem System immanent sein. In einem Sedimentationsexperiment ist nun die Zentrifugalkraft F die externe Kraft, zu der die „Diffusionskraft“ $-\nabla\mu$ hinzutritt:

$$\vec{J}_2 = L_{22} (\vec{F}_2 - m_2 \nabla \mu_2) \quad \text{Gleichung 03}$$

Das die Diffusion beschreibende chemische Potential $\mu = \partial G / \partial m$ ist nicht auf die Stoffmenge, sondern auf die Masse bezogen, da in der Ableitung mit Massenkonzentrationen gearbeitet wird.

Der Diffusionsterm kann gemäß $\nabla\mu_2 = (\partial\mu_2/\partial r) \vec{e}_r$ vereinfacht werden, da alle Kräfte nur in radialer Richtung in Erscheinung treten (die Corioliskraft ist vernachlässigbar [41]). Damit und mit $\vec{F} = m\omega^2 r \vec{e}_r$ wird *Gleichung 03* zu

$$J_2 = \frac{M_2}{N_A} L_{22} \left(\omega^2 r - \frac{\partial\mu_2}{\partial r} \right) \quad \text{Gleichung 04}$$

mit $m_2 = \frac{M_2}{N_A}$.

Um für L_{22} einen Ausdruck zu finden, geht man davon aus, daß die Partikel der Komponente 2, die von den Kräften aus *Gleichung 03* bzw. *Gleichung 04* beschleunigt werden, einer geschwindigkeitsproportionalen Reibungskraft $f_2 \langle v_2 \rangle$ ausgesetzt sind, wobei $\langle v_2 \rangle$ die mittlere Geschwindigkeit der Partikel ist, die mit dem Fluß gemäß $J_2 = c_2 \langle v_2 \rangle$ zusammenhängt.

Im Kräftegleichgewicht gilt daher: $L_{22} = \frac{J_2}{f_2 \langle v_2 \rangle} = \frac{c_2}{f_2}$

Verwendet man diesen Ausdruck in *Gleichung 04*, erhält man

$$J_2 = \frac{c_2 M_2}{f_2 N_A} \left(\omega^2 r - \frac{\partial\mu_2}{\partial r} \right) \quad \text{Gleichung 05}$$

Die Gültigkeit dieser Gleichung beruht auf der Annahme, daß der Reibungskoeffizient der betrachteten Substanz für Sedimentation wie für Diffusion identisch ist.

Um das chemische Potential aus *Gleichung 05* zu eliminieren, ist seine partielle Ortsableitung auszuwerten: In einem Ultrazentrifugenexperiment hängt μ von den Zustandsvariablen Druck, Konzentration und Temperatur ab, $\mu_2 = \mu_2(P, c_2, T)$, womit zu einem festen Zeitpunkt gilt:

$$\frac{\partial\mu_2}{\partial r} = \frac{d\mu_2}{dr} = \frac{\partial\mu_2}{\partial P} \frac{dP}{dr} + \frac{\partial\mu_2}{\partial c_2} \frac{dc_2}{dr} + \frac{\partial\mu_2}{\partial T} \frac{dT}{dr} \quad \text{Gleichung 06}$$

Der erste Faktor des ersten Summanden stellt das partialspezifische Volumen dar:

$$\frac{\partial\mu}{\partial P} = \frac{\partial^2 G}{\partial m \partial P} = \frac{\partial V}{\partial m} \equiv \bar{v} \quad \text{Gleichung 07}$$

Druckänderungen innerhalb der Lösung errechnen sich aus

$$dP = \rho \omega^2 r dr \quad \text{Gleichung 08}$$

Aus *Gleichung 07* und *Gleichung 08* wird die Bedeutung des ersten Summanden aus *Gleichung 06* ersichtlich: Er beschreibt den Auftrieb, dem ein sedimentierendes Makromolekül der Komponente 2 ausgesetzt ist. Im übrigen ist es durchaus möglich, daß sich das partialspezifische Volumen einer Substanz mit r merklich ändert, angesichts der großen Druckunterschiede, die in einer Probenkammer herrschen können, gemäß

$$P(r) = P(r_0) + \frac{\rho \omega^2}{2} (r^2 - r_0^2) \quad \text{Gleichung 09}$$

Im folgenden wird jedoch davon ausgegangen, daß eine derartige Abhängigkeit nicht besteht. Außerdem wird die Lösungsdichte als räumlich und zeitlich konstant betrachtet, eine Annahme, die für konzentrierte Lösungen im (starken) Zentrifugalfeld nicht mehr zutrifft.

Da für verdünnte Lösungen (Aktivitätskoeffizient 1) $\mu = \mu^0 + (RT/M) \ln c$ gilt, folgt weiter:

$$\frac{\partial \mu}{\partial c} = \frac{RT}{M} \frac{1}{c} \quad \text{Gleichung 10}$$

Damit ist der zweite Summand aus *Gleichung 06* ausgewertet. Er berücksichtigt die vom Konzentrationsgradienten herrührende Diffusion.

Der letzte Summand fällt weg, da bei Ultrazentrifugenuntersuchungen für gewöhnlich eine in jeder Hinsicht konstante Temperatur vorgesehen ist.

Setzt man nun *Gleichung 07*, *Gleichung 08* und *Gleichung 10* in *Gleichung 06* ein und diese wiederum in *Gleichung 05*, folgt nach Umformung:

$$J_2 = \left(\frac{M_2 (1 - \bar{v}_2 \rho)}{N_A f_2} \right) c_2 \omega^2 r - \left(\frac{kT}{f_2} \right) \frac{\partial c_2}{\partial r} \quad \text{Gleichung 11}$$

Es sei darauf hingewiesen, daß c_2 bzw. J_2 von Ort und Zeit abhängen: $c_2 = c_2(r, t)$; $J_2 = J_2(r, t)$.

Um *Gleichung 11* zu interpretieren, soll nun der Sedimentationsvorgang, der ihr zugrundeliegt, mechanisch beschrieben werden:

Betrachtet man die Sedimentation für sich (ohne Diffusion), driften die Partikel im Kräftegleichgewicht bei gegebener Zentrifugalkraft mit konstanter mittlerer Geschwindigkeit, die, bezieht man sie auf die Radialbeschleunigung, den Sedimentationskoeffizienten definiert:

$$s \equiv \frac{\langle v_s \rangle}{\omega^2 r} \quad \text{Gleichung 12}$$

s wird in Svedberg-Einheiten gemessen: 1 Svedberg = 1 S = 10^{-13} sec.

Der Fluß der Komponente 2, der auf Sedimentation beruht, $J_{2s} = c_2 \langle v_{2s} \rangle$, beträgt so:

$$J_{2s} = c_2 s_2 \omega^2 r \quad \text{Gleichung 13}$$

Für den Fluß aufgrund der Diffusion entlang des entstehenden Konzentrationsgefälles gilt nach dem ersten Gesetz von Fick:

$$J_{2D} = -D_2 \frac{\partial c_2}{\partial r} \quad \text{Gleichung 14}$$

Die Flüsse aus *Gleichung 13* und *Gleichung 14* überlagern sich und ergeben den gesamten Fluß der Komponente 2:

$$J_2 = s_2 \cdot c_2 \omega^2 r - D_2 \cdot \frac{\partial c_2}{\partial r} \quad \text{Gleichung 15}$$

Stellt man nun diese Beziehung – aus der im Übrigen unmittelbar hervorgeht, daß bzw. wie man über die Drehzahl des Rotors den Einfluß der Diffusion im Vergleich zur Sedimentation steuern kann – *Gleichung 11* gegenüber, lassen sich in letzterer die beiden Flüsse J_{2s} und J_{2D} identifizieren, und man erhält über Koeffizientenvergleich:

$$s = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{N_A f} \quad \text{Gleichung 16}$$

$$D = \frac{kT}{f} \quad \text{Gleichung 17}$$

Die Kombination von *Gleichung 16* mit *Gleichung 17* (bekannt als „Einstein-Relation“) liefert die sogenannte Svedberg-Gleichung:

$$M = \frac{sRT}{D(1 - \bar{v}\rho)} \quad \text{Gleichung 18}$$

Aus *Gleichung 16* bzw. *Gleichung 18* geht unmittelbar hervor, daß der Sedimentationskoeffizient eine „Materialkonstante“ ist, die bei gegebenem Puffer und bei gegebener Temperatur T das Sedimentationsverhalten einer Partikelsorte charakterisiert. Um den s-Wert auf eine von den zufälligen Bedingungen seiner Bestimmung unabhängige Größe zu reduzieren, wird er auf Standardbedingungen (Wasser bei 20°C) umgerechnet. Den standardisierten s-Wert erhält man gemäß:

$$S_{20^{\circ}\text{C},\text{Wasser}} = S_{20,\text{W}} = S \cdot \frac{(1 - \bar{v}\rho)_{20^{\circ}\text{C},\text{Wasser}} \cdot \eta_{\text{T,Puffer}}}{(1 - \bar{v}\rho)_{\text{T,Puffer}} \cdot \eta_{20^{\circ}\text{C},\text{Wasser}}} \quad \text{Gleichung 19}$$

Bis hier beschränkte sich die Ableitung auf ein Zweikomponentensystem. Führt man nun neben dem Lösungsmittel und dem gelösten Makromolekül (n-2) weitere Komponenten in Form weiterer Sorten gelöster Makromoleküle ein, so überlagern sich die Flüsse der Komponenten 2 bis n. Sie überlagern sich linear, wenn die Komponenten 2 bis n nicht interagieren, vorausgesetzt, es herrschen (quasi-) ideale Verhältnisse. Im weiteren Verlauf der Darstellung wird diese Voraussetzung unterstellt, da in der vorliegenden Arbeit Nichtidealitäten bei der Untersuchung von Proteinen vermieden werden konnten, insbesondere Konzentrationseffekte durch entsprechende Verdünnung und Ladungseffekte durch geeignete Elektrolytzugabe.

Damit wird, ausgehend von *Gleichung 11*, ein Sedimentationsexperiment mit nicht-interagierenden Makromolekülen wie folgt allgemein beschrieben:

$$\sum_{i=2}^n J_i = \sum_{i=2}^n \left(\left(\frac{M_i (1 - \bar{v}_i \rho)}{N_A f_i} \right) c_i \omega^2 r - \left(\frac{kT}{f_i} \right) \frac{\partial c_i}{\partial r} \right) \quad \text{Gleichung 20}$$

Dabei sollen folgende Randbedingungen gelten: $J_i(r_m, t) = J_i(r_b, t) = 0$; $0 \leq t$; $c_i(r, 0) = c_{i0}$.

Theoretisch erhält man schließlich den exakten Sedimentationsverlauf aus den analytischen Lösungen der aus *Gleichung 20* unter den genannten Randbedingungen abgeleiteten „**Lamm-Gleichung**“, $\partial c_i / \partial t = 1/r \cdot \partial(r J_i) / \partial r$ [41] [69]. Praktisch wird die Lamm-Gleichung näherungsweise analytisch oder numerisch gelöst.

Es wird nun der wichtigste Spezialfall, das Sedimentationsgleichgewicht, näher betrachtet:

Im Sedimentationsgleichgewicht heben sich Sedimentation und Diffusion überall auf, d.h. es verschwindet der (Gesamt-) Fluß aller Komponenten überall in der Lösung: $J_i = 0$. Damit sind Konzentrationen nur noch orts-, aber nicht mehr zeitabhängig: $c_i = c_i(r)$.

Unter der Bedingung $J_i = 0$ folgt aus *Gleichung 20* für die i-te Komponente ($2 \leq i \leq n$):

$$\frac{M_i (1 - \bar{v}_i \rho) \omega^2}{RT} = \frac{1}{c_i r} \frac{\partial c_i}{\partial r} = 2 \frac{\partial \ln c_i}{\partial r^2} \quad \text{Gleichung 21}$$

Man beachte, daß f eliminiert wird.

Die Lösung dieser Differentialgleichung liefert eine Boltzmannverteilung der Konzentration, wobei als Randbedingung die Konzentration an einem Bezugspunkt r_0 gewählt wird:

$$c_i(r) = c_i(r_0) \exp \left[\frac{M_i(1 - \bar{v}_i \rho) \omega^2}{2RT} (r^2 - r_0^2) \right] \quad \text{Gleichung 22}$$

Die radiusabhängige Gesamt- (Massen-) Konzentration der gelösten Bestandteile in einem n-Komponentensystem, das Konzentrations- „Profil“ (s. *Abbildung 3.2*), ergibt sich schließlich durch Linearkombination der Boltzmannfunktionen der Komponenten 2 bis n:

$$c_{\text{ges}}(r) = \sum_{i=2}^n c_i(r) \quad \text{Gleichung 23}$$

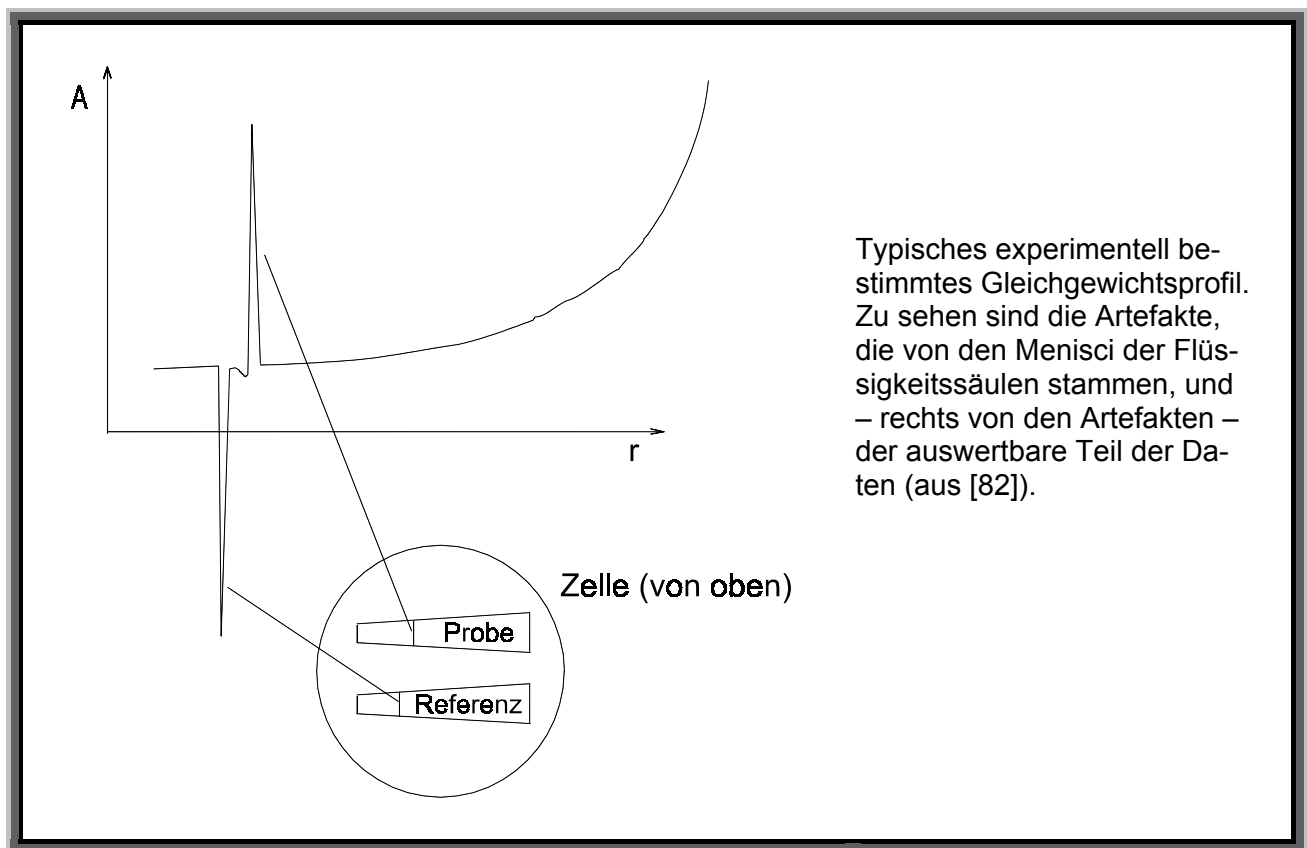
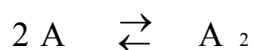


Abbildung 3.2

Abschließend soll anhand von Selbstassoziation das Verhalten wechselwirkender Makromoleküle im Sedimentationsgleichgewicht beleuchtet werden.

Ausgangspunkt sei ein einfaches Monomer-Dimer-Gleichgewicht:



Für die Gleichgewichtskonstante dieser Reaktion, k_A , gilt nach dem Massenwirkungsgesetz $k_A = c_D/c_M^2$, wobei c_M und c_D die Massenkonzentrationen des Monomers bzw. Dimers sind.

Angenommen, A und A_2 wären stabile, voneinander unabhängige Komponenten: Entsprechend verteilen sich im Sedimentationsgleichgewicht beide Komponenten unabhängig voneinander, gemäß der jeweiligen Boltzmannfunktion mit der Monomerenmolmasse M und der Dimerenmolmasse $2M$. Bildet man das Verhältnis der beiden Verteilungen, $c_D(r)/c_M(r)$, folgt unter der nicht selbstverständlichen Voraussetzung, daß die partialspezifischen Volumina von Monomer und Dimer identisch sind:

$$\frac{c_D}{c_M^2}(r) = \frac{c_D}{c_M^2}(r_0) \quad \text{Gleichung 24}$$

Gestattet man nun den beiden Komponenten ihr Assoziationsverhalten, ändert sich das Profil der Gesamtkonzentration, $c_{\text{ges}}(r)$, an keiner Stelle, denn nach Gleichung 24 ist das Massenwirkungsgesetz an jedem Ort bereits gültig. Dieser Befund ist offensichtlich unabhängig von der Rotorgeschwindigkeit und der Temperatur (ω und T beeinflussen lediglich das Monomer-Dimer-Konzentrationsverhältnis, mit dem das Gedankenexperiment starten muß).

Das soeben für ein Monomer-Dimer-Assoziationsgleichgewicht abgeleitete Prinzip und damit Gleichung 23 gelten ebenso für kompliziertere homogene Systeme und für heterogene reversible Assoziationen.

3.3 Apparatives

Die vorliegende Arbeit bediente sich der analytischen Ultrazentrifuge „Optima XL-A“ von Beckman, die mit einer Absorptionsoptik ausgestattet ist.

Das Kernstück des mechanischen Systems ist ein Titanrotor mit 4 bzw. 8 Bohrungen (An-60 Ti bzw. An-50 Ti). 3 bzw. 7 Bohrungen können mit Probenzellen bestückt werden, die letzte ist zu Kalibrierungszwecken mit einem Gegengewicht zu besetzen. Eine Probenzelle beinhaltet ein Mittelstück, das mit 2 bzw. 6 Kammern durchlöchert ist (2-Kanal bzw. 6-Kanal-Standard-EPON-Mittelstück), und 2 Quarzfenster, die diese Kammern abschließen. In 2-Kanal-Mittelstücken sind die Kammern sektorförmig geschnitten („Sektoren“) und darum für s-Läufe geeignet, da ihre Seitenwände den Materialtransport nicht (bzw. minimal) behindern. Ein Sektor ist für die Probe vorgesehen, der andere für die Referenzlösung (in der Regel Wasser). In 6-Kanal-Mittelstücken sind die Kammern rechteckig geschnitten und bilden drei Probe-Referenz-Paare. Sie sind im Falle von Gleichgewichtsläufen den 2-Kanal-Mittelstücken vorzuziehen: Sie bieten durch die Möglichkeit, eine Probe auf mehrere Kammern zu verteilen,

ein besseres Verhältnis zwischen der Datenmenge und der Proben-Füllhöhe ($r_m - r_b$), welche die Dauer der Gleichgewichtseinstellung bestimmt.

Gerät und Rotor ermöglichen Untersuchungen zwischen ca. 2 000 Upm und 50 000 Upm. Ist der Rotor ungleichmäßig beladen, ist das Gerät in gewissem Rahmen in der Lage, dies durch Verschiebung der Drehachse zu kompensieren. Um ein Erhitzen bzw. ein Abheben des Rotors aufgrund von Luftreibung zu vermeiden, wird die Rotorkammer evakuiert. Allerdings besteht das Vakuumsystem lediglich aus einer Öl-Diffusionspumpe mit vorgeschalteter Rotationspumpe (für das Vorvakuum), was die Rotorkammer, insbesondere die darin enthaltene Optik, sukzessive mit Öl kontaminiert. Der serienmäßige Einbau zumindest einer Kühlfalle, besser einer Turbomolekularpumpe (d.h. der technische Mindeststandard) wäre von daher dringend erforderlich.

Die Temperatur, je nach Stand des Vakuums in der Luft oder am Rotor (über Wärmestrahlung) gemessen, wird während eines Experiments auf 0,1°C genau konstant gehalten, um Konvektion zu vermeiden.

Das optische System (s. *Abbildung 3.3*) entspricht im wesentlichen einem in die Zentrifuge eingebauten Zweistrahlphotometer. Eine Xenon-Hochdruck-Blitzlampe liefert einen Lichtblitz, wenn sich Probe bzw. Referenz im Strahlengang befindet. Die Triggerung erfolgt über einen am Rotor befindlichen magnetischen Kodiering. Das Licht trifft zunächst auf ein drehbares toroidales (krapfenförmiges) Beugungsgitter, wodurch man monochromatisches Licht innerhalb eines Wellenlängenbereichs von ca. 200-800 nm [7] mit einer Auflösung von 3,5-4 nm [124] erhält. Ein Teil davon wird anschließend von einem halbdurchlässigen Spiegel abgezweigt, um damit die aktuelle Lampenleistung zu messen; so erhält man einen Referenzwert, der Schwankungen der Lichtintensität, die von der Lampe ausgehen, zu berücksichtigen gestattet. Das Haupt- Lichtbündel passiert den Proben- bzw. Referenzsektor und trifft auf ein radial bewegliches optisches System (Radialscanner), bestehend aus sphärischen Linsen und einem mit einem dünnen Spalt versehenen Plättchen, worauf das Lichtbündel von den Linsen abbildet wird (vom Standpunkt einer optimalen Optik unverständlich ist die Verwendung sphärischer Linsen anstelle von Zylinderlinsen: u.a. minimieren letztere Störungen durch Streulicht). Der Spalt hat die Aufgabe, nur Licht zur Messung zuzulassen, das einer bestimmten Radialposition zugeordnet werden kann. Diese Zuordnung erfolgt mit einer der endlichen Spaltbreite geschuldeten Auflösung von 10 µm [124]. Die Radiusmessung wird anhand zweier Marken kalibriert, die sich am Gegengewicht befinden. Die Photonen, die den beweglichen Spalt passiert haben, treffen auf eine Photozelle,

die mit einem Sekundärelektronenvervielfacher verbunden ist (Photomultiplier). Das verstärkte Signal landet letztlich im Rechner, der Intensität, Absorption, Radialposition und Standardabweichung (bei mehreren Messungen pro Radialposition, mehreren „averages“) registriert.

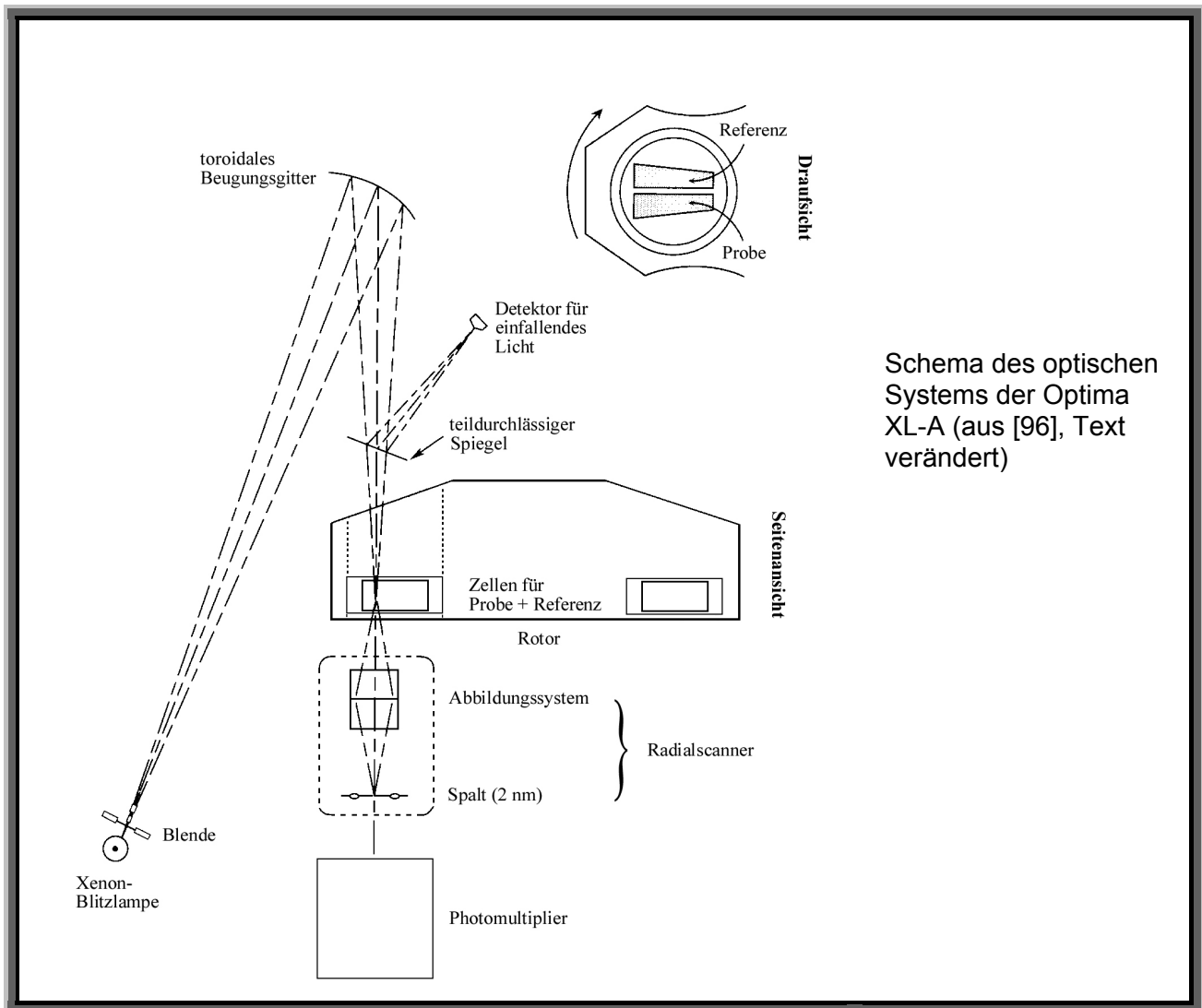


Abbildung 3.3

Die im Photomultiplier gemessene und auf die Lampenleistung bezogene Intensität hängt von der Dicke der im Strahlengang befindlichen absorbierenden Schicht, vom Extinktionskoeffizienten der Proben- bzw. Referenzlösung und – weswegen gemessen wird – von der Konzentration der absorbierenden Substanz ab: $I(r,t,\lambda) = I_0 \cdot 10^{-c(r,t)\varepsilon(\lambda)d}$, mit der Absorption:

$$A(r,t,\lambda) = c(r,t)\varepsilon(\lambda)d$$

Gleichung 25

I wird sowohl für den Proben- als auch für den Referenzsektor bestimmt, um daraus zu errechnen, wieviel monochromatisches Licht der Wellenlänge λ die in der Probe gelöste Substanz absorbiert. Sind d und ϵ fest (Schichtdicke d in der Optima XL-A: 1,2 cm), ist diese Absorption direkt proportional zur Konzentration der Substanz, diese wiederum ist in einem Ultrazentrifugenexperiment abhängig von der Radialposition und – gegebenenfalls – von der Zeit. Die Proportionalität zwischen A und c gilt in der Optima XL-A bei 280 nm bis etwa 1,5 OD (OD: „optische Dichte“; dimensionslose Absorptionseinheit) [124].

Die Optik der Optima XL-A liefert neben Absorptionsprofilen, wenn gewünscht, Wellenlängenspektren in Abhängigkeit von der Radialposition.

3.4 Durchführung von Ultrazentrifugenexperimenten

3.4.1 s-Läufe

Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente wurden unter Verwendung von 2-Kanal-Mittelstücken durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Füllvolumina von Probe und zugehöriger Referenz praktisch identisch waren, um angesichts hoher Rotordrehzahlen Druckunterschiede zwischen den Flüssigkeitssäulen zu vermeiden, die zur partiellen Vermischung der beiden Flüssigkeiten führen können.

Eine Bemerkung zur Positionierung der Probenzelle im Rotor, die speziell bei s-Läufen sorgfältig durchzuführen ist, da mit der Abweichung der Sektorwände von der radialen „Idealinie“ die Gefahr von Konvektion im Probensektor steigt: Eine Zelle wird üblicherweise radial ausgerichtet, indem man Justiermarken an Zelle und Rotor zur Deckung bringt. Dieses Verfahren kann jedoch zu beträchtlicher Fehljustierung führen, merklich entweder mit bloßem Auge oder nach Messung der Bodenpositionen von Proben- und Referenzsektor. Empfohlen wird ein anderes Justage- „Verfahren“, zumindest zur Kontrolle: Augenmaß unter Zuhilfenahme eines von der Drehachse des Rotors aus gespannten Fadens.

Die wirkungsvollste Quelle von Konvektion sind Temperaturdifferenzen innerhalb der Kammer. Um diese Differenzen zu vermeiden, wurde zu Beginn eines Laufs bei einer für Sedimentation zu niedrigen Rotorgeschwindigkeit (in der Regel 3 000 Upm) bis zur Einstellung der gewünschten Temperatur zentrifugiert. Unmittelbar anschließend wurde die für die Analyse gewünschte Rotorgeschwindigkeit eingestellt (Beschleunigung: maximal).

Die zeitliche Entwicklung des $A(r)$ - Profils wurde von Beginn an bis zur weitgehenden Sedimentation der Probe im Abstand von einigen Minuten aufgenommen. Wegen der schnellen

Änderung des Profils durften die einzelnen Scans („step mode“; radiale Schrittgröße Δr : 0,001 cm oder 0,002 cm) nur kurze Zeit in Anspruch nehmen. Aus diesem Grund wurden keine oder nur wenige Meßwiederholungen innerhalb eines Scans durchgeführt.

3.4.2 Gleichgewichtsläufe

Überblick:

Sedimentationsgleichgewichtsexperimente wurden mit 6-Kanal-Mittelstücken durchgeführt. Zu Laufbeginn wurden zur Kontrolle und zur ungefähren Bestimmung der Anfangsabsorption die Zellen bei einer Rotordrehzahl von 3 000 Upm gescannt. Anschließend, gegebenenfalls nach „Overspeed“, wurde die „Gleichgewichtsgeschwindigkeit“, d.h. die für das Sedimentationsgleichgewicht vorgesehene Rotordrehzahl, eingestellt und bis zur Messung der Gleichgewichts- $A(r)$ -Profile und der Bodenpositionen beibehalten. Im Falle der Untersuchung von Proteinen wurde zu Ende des Laufs eine hohe Rotordrehzahl (40 000 Upm) eingestellt, um nach dem Absedimentieren der Makromoleküle nach erneutem Wechsel auf die Gleichgewichtsgeschwindigkeit die Basislinien zu messen.

Details:

Ein Gleichgewichtslauf kann verkürzt werden, indem – auf Kosten der möglichen Datenmenge – das Probenvolumen verringert wird, oder durch eine überhöhte Rotordrehzahl zu Beginn eines Laufes („Overspeed“). Letztere Variante ist mit Bedacht einzusetzen, da bei übertriebenem Overspeed wegen der Rückdiffusion das Gegenteil des erwünschten Effekts eintritt. Außerdem besteht bei zu hoher Geschwindigkeit bzw. zu langem Overspeed die Gefahr einer irreversiblen Aggregation des Probenmaterials.

Die Änderungen von $A(r)$ -Profil zu $A(r)$ -Profil bis hin zum Sedimentationsgleichgewicht lassen sich durch Überlagern von Radialscans beobachten. Das Vorliegen eines praktisch (nicht theoretisch!) stabilen Zustandes kann demnach dadurch festgestellt werden, daß zwei im Abstand von Δt aufgenommene Profile im Rahmen des Rauschens identisch sind (abgesehen ggf. von einer Basislinienverschiebung). Hier wird als Faustregel angenommen, daß Δt mindestens 10% der De-facto-Gleichgewichtseinstellungsdauer betragen muß.

Für die Messung der Gleichgewichtsprofile gilt es, im Hinblick auf ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis die geeignete Meß-Wellenlänge zu wählen. Diese muß gegebenenfalls anhand eines in der Ultrazentrifuge gemessenen Absorptionsspektrums der interessierenden Substanz ermittelt werden: Gesucht ist eine Wellenlänge λ , bei der die Substanz einerseits deutlich absorbiert, deren Umgebung im Spektrum andererseits möglichst „flach“ ist.

Bei gegebener Wellenlänge wird das Signal-Rausch-Verhältnis natürlich verbessert, wenn man jede Radialposition mehrfach mißt und die Ergebnisse mittelt (Funktion „averages“). Dies ist allerdings nur in gewissem Rahmen sinnvoll bzw. ratsam: Erstens werden damit nur die statistischen Fehler verringert, so daß bei einer entsprechend großen Anzahl von Meßwiederholungen die systematischen Fehler, z.B. Fensterfehler, die Grenze der Genauigkeit definieren. Zweitens können Scans mit vielen „averages“ viele Stunden dauern (eine weitere Schwäche der Optima XL-A), ein Problem insbesondere im Hinblick auf zeitlich instabile Proben. Drittens können manche Untersuchungsobjekte unter (übermäßigem) Lichteinfluß zerstört oder „ausgebleicht“ werden.

Die Positionen der Kammerböden, r_b , wurden bei der Gleichgewichtsgeschwindigkeit bestimmt, da die Rotormaße mit der Rotordrehzahl etwas variieren (s. Manual zur Optima XL-A). Die Bestimmung erfolgte über „Intensitätsscans“, welche für Proben- und Referenzsektor getrennt die radiale Abhängigkeit der im Photomultiplier gemessenen Lichtintensität liefern. Sie sind bei einer Wellenlänge durchzuführen, bei der die Bestandteile der Probe nicht absorbieren. Die Meniskuspositionen, r_m , sind in den Intensitätsscans ebenfalls erkennbar, sie werden aber üblicherweise den Gleichgewichts-Absorptionsscans entnommen.

Zur Messung der Basis (-linie), der ortsunabhängigen Absorption, in proteinhaltigen Proben wurden zunächst bei einer Drehzahl von 40 000 Upm die Makromoleküle (weitgehend) abzentrifugiert, um unmittelbar anschließend bei der Gleichgewichtsgeschwindigkeit (und der entsprechenden Wellenlänge) ein $A(r)$ -Profil aufzunehmen. Der horizontale Teil eines derartigen Profils, der sich vom Probenmeniskus bis weit ins Probeninnere erstreckt, entspricht der Basis. Die Umständlichkeit, das Basis-Profil bei der Gleichgewichtsgeschwindigkeit anstatt bei 40 000 Upm aufzunehmen, ist eine Konsequenz daraus, daß die Optima XL-A „Offsets“, apparative Basislinien (schlimmstenfalls sogar Basis- „Kurven“!), produziert, die drehzahlabhängig sind.

3.5 Auswertung

3.5.1 Auswertung von s-Läufen

Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente werden bei Rotordrehzahlen durchgeführt, bei denen der Einfluß der Sedimentation dominiert, da Diffusion die Betrachtung der Sedimentation prinzipiell stört. Um diese Störung zu beherrschen, wurden verschiedene, zunehmend anspruchsvollere Verfahren zur Auswertung von gemessenen Sedimentationsverläufen ent-

wickelt. Vor einer Darstellung dieser Verfahren sei ein Sedimentationsverlauf am Beispiel einer ideal sedimentierenden homogenen Substanz skizziert:

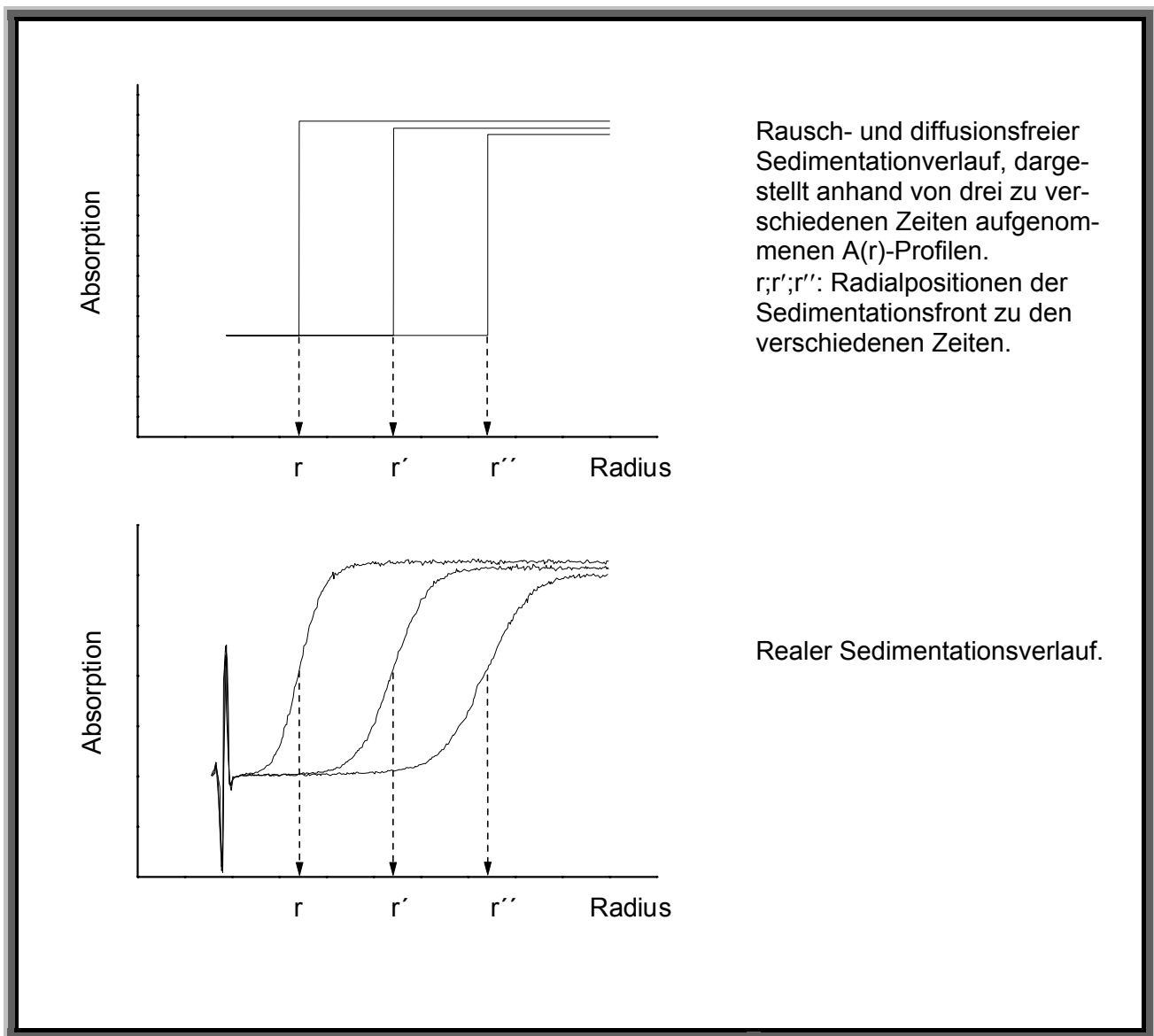


Abbildung 3.4

Abbildung 3.4 oben zeigt die Sedimentation „pur“, also den Grenzfall $D = 0$; Rauschen = 0. Man sieht, daß in Meniskusnähe die Substanz verschwindet – es bildet sich das „untere Plateau“ –, während rechts von der Sedimentations- „Front“, die die Bewegung der Partikel repräsentiert, das „obere Plateau“ verläuft (der aus dem sedimentierten Material gebildete Bodensatz ist nicht eingezeichnet). Am oberen Plateau ist zu gegebener Zeit die Konzentration (Absorption) konstant, wegen der Sektorform der Probenkammer nimmt diese Konzentration

(Absorption) jedoch im Laufe der Zeit ab („radiale Verdünnung“). *Abbildung 3.4 unten* zeigt den realen Fall mit Rauschen und einer durch Diffusion verbreiterten Sedimentationsfront. Derartige Sedimentationsverläufe überlagern sich im Falle mehrerer ($n-1$) sedimentierender Lösungsbestandteile linear, wenn diese nicht interagieren. $A(r,t)$ zeigt dann $n-1$ versetzt übereinanderliegende Sedimentationsfronten („Stufen“) mit durch Diffusion verschmierten Übergängen. Im Falle reversibler Assoziation ist die Superposition nichtlinear, was sich im Wesentlichen als zusätzliche Verwischung der einzelnen Fronten äußert. Im Extremfall liegt eine einzige breit verschmierte Bande vor.

Die Auswerteverfahren:

- „Methode der mittleren Konzentration“: Bei einem zum gegebenen Zeitpunkt t aufgenommenen $A(r)$ - bzw. $c(r)$ -Profil wird das arithmetische Mittel der beiden von den Plateaus definierten Konzentrationen bestimmt und die dieser mittleren Konzentration zugeordnete Radialposition mit der Position der Front zur Zeit t , $r_F(t)$, identifiziert [5]. Mit einer Reihe von r_F - t -Wertepaaren, die von $A(r)$ -Profilen mit erkennbaren Plateaus gewonnen werden können, läßt sich aus der logarithmischen Form von *Gleichung 12* ein über die verschiedenen sedimentierenden Komponenten gemittelter Sedimentationskoeffizient gewinnen (wenn sich deutliche Stufen bilden, kann jede Komponente getrennt ausgewertet werden).
- „Ableitungsmethode“: $r_F(t)$ einer sedimentierenden Komponente (und damit ihr s -Wert) wird aus dem zugehörigen – zeitabhängigen – Maximum der ersten Ableitung, $\partial c/\partial r$ bzw. $\partial A/\partial r$, gewonnen. Für dieses Verfahren ist die klare Herausbildung von Plateaus nicht erforderlich. Dafür ist es notwendig, vor der Bildung der Ableitungen durch Glättung das Rauschen aus den gemessenen Kurven zu eliminieren, wodurch bei ungünstigem Signal-Rausch-Verhältnis, wie es z.B. bei sehr verdünnten Proben gegeben ist, Übergänge zwischen einzelnen Stufen verschwinden können. Der wesentliche Einwand gegen die Ableitungsmethode ist allerdings, daß wegen der Sektorform der Probenkammer die Identifizierung des Maximums von $\partial c/\partial r$ mit r_F theoretisch nicht korrekt ist [47].
- „Methode der zweiten Momente“: Dieses Verfahren berücksichtigt die Sektorform. Es liefert theoretisch den korrekten s -Wert einer einheitlichen Substanz. Im inhomogenen Fall erhält man einen gewichteten Mittelwert über alle einzelnen s -Werte [47]. Nachteil: Liegt eine langsam sedimentierende Substanz vor, führt diese Methode zu fehlerhaften Ergebnissen bzw. wird ungenau, da sie auf einem klar ausgebildeten unteren Plateau beruht.

- „Transportmethode“: Dieses Verfahren nutzt den Zusammenhang zwischen dem s -Wert einer Substanz und ihrem Fluß durch eine gedachte Fläche, die das obere Plateau senkrecht zur Orientierung des Radiusvektors schneidet, unter der Bedingung der Massenerhaltung. Mangels Konzentrationsgefälles am Plateau ist dieser Zusammenhang diffusionsbereinigt (s. *Gleichung 13*) und führt im Falle einer einheitlichen Substanz zum theoretisch korrekten $r_F(t)$ [107]. Im inhomogenen Fall erhält man einen gemittelten s -Wert, eine Auflösung der verschiedenen sedimentierenden Bestandteile ist nicht möglich.
- „ $g(s)$ -Methode“: Diese Methode behandelt einen Sedimentationsverlauf, als rührte er von einer (quasi-) kontinuierlichen s -Wert-Verteilung aus nichtdiffundierenden Bestandteilen [122] [130]. Damit werden Diffusions-Effekte in scheinbare Sedimentationskoeffizienten verwandelt. Ein realer s -Wert äußert sich bei diesem Verfahren im Prinzip als (lokales) Maximum einer $g(s)$ -Funktion, die man auch – qualitativ – als Wahrscheinlichkeitsfunktion von s deuten kann. Die $g(s)$ -Methode ist optimal z.B. bei der Untersuchung polydisperser Nanopartikel, da diese das zugrundeliegende Modell nahezu realisieren. Für die Untersuchung von Partikeln in der Größenordnung von Proteinen ist das Modell jedoch lediglich eine Hilfskonstruktion und beschränkt wegen seiner deutlichen Abweichung von der Wirklichkeit das Auflösungsvermögen.
- „van Holde-Weischet-Methode“: Diese Methode basiert auf einer Näherungslösung der Lamm-Gleichung, der Faxén-Näherung, aus der hervorgeht, daß die Sedimentation linear mit der Zeit voranschreitet, während sich die Diffusion nur mit der Quadratwurzel der Zeit entwickelt [152]. Theoretisch läßt sich damit nach unendlicher Experimentierdauer, unbegrenzte Flüssigkeitssäule in der Probenkammer vorausgesetzt, Sedimentation und Diffusion komplett trennen. Praktisch wird der gemessene Sedimentationsverlauf, $c(r,t)$, Scan für Scan zwischen den Plateaus – die wohldefiniert sein müssen – in N äquidistante Fraktionen geteilt, um für jede einzelne Fraktion den Fortschritt des zugehörigen Teils der Sedimentationsfront so auszuwerten, als bestünde die Fraktion aus einer von N nichtdiffundierenden, unabhängigen Komponenten. Eine Extrapolation der i.A. zeitlich veränderlichen scheinbaren s -Werte der einzelnen Fraktionen auf $t = \infty$ liefert schließlich N reale s -Werte. Diese sind gemittelt, wenn sie aus Fraktionen hervorgehen, in denen während des Experiments keine vollständige Trennung verschiedener (realer) Komponenten erfolgte. Die van Holde-Weischet-Analyse ist damit ein – modellfreies – Verfahren, Inhomogenitäten (sowie Nichtidealitäten) aufzuspüren. Ihre Möglichkeiten hinsichtlich quantitativer Aussagen sind allerdings begrenzt [121].

- „c(s)-Methode“: Die c(s)- (bzw. c(M)-) Analyse ist die modernste, allen bisher besprochenen Verfahren überlegene Methode [121]. Sie paßt an die experimentellen Daten direkt eine theoretisch kontinuierliche Verteilung von Lamm-Gleichungs-Lösungen, c(s), an, womit diskrete Probleme miterfaßt sind [125] [127]. Die Anpassung erfolgt praktisch über Linearkombinationen von diskreten Lamm-Gleichungs-Lösungen, wobei die Annäherung an den kontinuierlichen Fall durch Steigerung der „Auflösung“, der Anzahl der s-Wert-Schritte im gewählten s-Wert-Bereich, erfolgt. Als Kriterium für die Qualität der Anpassung wird die Fehlerquadratsumme herangezogen. Deren Minimierung liefert allerdings i.A. eine c(s)-Verteilung, die von den Zufälligkeiten statistischen oder systematischen Rauschens abhängt und in der die Daten überinterpretiert sind (dies äußert sich als Vielzahl von Peaks). Deshalb wird eine Regularisierungsprozedur durchgeführt: Hierbei werden in einem selbstgewählten Rahmen gemäß Fehlerquadratsummenkriterium suboptimale c(s)-Verteilungen zugelassen. Aus dieser Menge wird schließlich nach Ausmusterung physikalisch unsinniger Elemente die einfachste Verteilung ausgewählt. Das Endresultat enthält damit nur noch die wahrscheinlichsten Peaks – bei einer „F-ratio“ von X% mit $50 < X < 100$ erscheinen nur Peaks, die mit X% Wahrscheinlichkeit existieren. Die unwahrscheinlicheren Peaks, die für den gemäß Fehlerquadratsummenkriterium optimalen Fit nötig wären, verschwinden allerdings um den Preis einer Verbreiterung der verbleibenden Peaks; im Falle eines diskreten Problems erscheint also eine s-Wert-Unsicherheit als entsprechend breites s-Wert-Kontinuum. Darüber hinaus kommt eine von der Datenqualität unabhängige Ungenauigkeit ins Spiel: dadurch, daß die Analyse, sofern kein entsprechendes Vorwissen existiert, von ein und demselben gewichtsmittleren relativen Reibungskoeffizienten für alle sedimentierenden Bestandteile ausgeht. Gegenüber diesem systematischen Fehler ist die c(s)-Analyse allerdings ausgesprochen unempfindlich, ebenso gegen fehlerhafte Angaben z.B. des (gemittelten) partialspezifischen Volumens der beobachteten Makromoleküle. Das zur Zeit konkurrenzlose Auflösungsvermögen der Methode – kein anderes Verfahren kann gegenwärtig eine derart große Datenmenge verarbeiten wie die c(s)-Methode – und ihre Zuverlässigkeit werden dadurch nur wenig beeinflusst [121] [127]. Die Zuverlässigkeit bezieht sich allerdings (zunächst) nur auf die Untersuchung idealer nichtinteragierender Makromoleküle. Im Falle von Nichtidealitäten oder – was hier wichtig ist – von reversibler Assoziation liefert die c(s)-Verteilung ein notwendig falsches Bild, über dessen Interpretation noch kaum Erfahrungen vorliegen.

Die letzten beiden Methoden sind die für die vorliegende Arbeit wesentlichen; es folgen einige Details ihrer Anwendung:

- van Holde-Weischet-Methode: Bei der Auswahl der Scans wurde zum einen darauf geachtet, daß jeder Scan zwei wohldefinierte Plateaus besitzt. Zum anderen galt es Kompromisse zu finden zwischen zu vielen und zu wenigen Scans: Bei vielen Scans reduziert das Auswerteprogramm die Anzahl der Fraktionen auf schlimmstenfalls $N=1$ (da plateaunahe Fraktionen unzuverlässige Werte liefern, ist die Zahl der nutzbaren Fraktionen ohnehin reduziert); bei sinkender Anzahl von Scans steigt die Ungenauigkeit der Extrapolation. Demnach sind wenige Scans mit großem zeitlichen Abstand optimal.
- $c(s)$ -Methode: (1) Durch Aktivieren der Funktion „don't load spikes“ wurden Ausreißer in den Rohdaten nicht zugelassen. (2) Durch Aktivieren der Funktion „times from $\omega^2 t$ “ wurde die Startphase des Laufs berücksichtigt. (3) Der s -Wert-Bereich wurde so gewählt, daß die an den Rändern des Bereichs auftretenden Auswertartefakte keinen Einfluß auf die schnellste bzw. langsamste Komponente hatten. (4) Die Auflösung wurde so hoch gewählt, daß eine Steigerung der Auflösung keinen Effekt zeitigte. – Wegen (3) und (4) waren die Berechnungen maximal genau, aber auch sehr zeitaufwendig. – (5) Die Funktion „fit time independent noise“ wurde aktiviert, welche neben der Basislinie einen radius-abhängigen „Offset“ berechnet. Diese Berechnung ist sehr genau, wenn sie sowohl auf unmittelbar nach Laufbeginn aufgenommene Scans als auch auf späte Scans, die weitgehend materialfreies Zentrifugat zeigen, zurückgreifen kann. (6) Zur Regularisierung wurde die „maximum entropy“-Prozedur gewählt, die einerseits die einfachste $c(s)$ -Verteilung, die die Daten erklären kann, findet und andererseits scharfe Peaks in der Verteilung gestattet, wenn diese für die Anpassung nötig sind. (7) Der gewichtsmittlere relative Reibungskoeffizient wurde via Anpassungsrechnung ermittelt, das mittlere partialspezifische Volumen der sedimentierenden Komponenten sowie Dichte und Viskosität des Probenpuffers waren gegeben. (8) Die Residuen einer Anpassung, d.h. die einzelnen Differenzen zwischen den Meßwerten und den zugeordneten, aus der Anpassung folgenden theoretischen Werten, wurden als Bitmap abgespeichert [121]. Hierbei werden die Differenzen in eine Grauskala übersetzt (große Differenzbeträge: weiß bzw. schwarz; kleine Differenzbeträge: grau) und in Zeilen (ein Scan pro Zeile) und Spalten (eine Radialposition pro Spalte) aufgetragen.

Auswertesoftware:

„SEDFIT version 5.2“ von Peter Schuck (c(s)-Analyse und van Holde-Weischet-Methode); „XL-A Data analysis version 2.01“ (Methode der zweiten Momente, Transportmethode und g(s)-Analyse); „SEDNTERP version 1.06“ (verschiedene Berechnungen).

3.5.2 Auswertung von Gleichgewichtsläufen

Die Auswertung einer zeitlich konstanten Konzentrationsverteilung $c(r)$, nach *Gleichung 22* und *Gleichung 23* eine Linearkombination von Boltzmannfunktionen, setzt die Vorgabe eines Modells, eines Satzes effektiver Molmassen, $M_{\text{eff}} = M(1 - \bar{v}\rho)$, voraus. Da ein Modell dann korrekt ist, wenn sich sämtliche Bestandteile, aus denen sich $c(r)$ zusammensetzt, im Modell wiederfinden, scheint grundsätzlich ein möglichst umfangreiches Modell geboten. Allerdings sind i.A. bereits vier sedimentierende Komponenten nicht mehr eindeutig zu trennen, so daß man auf externe Informationen über das Untersuchungsobjekt angewiesen ist, mit deren Hilfe man das Modell von überflüssigen Komponenten befreien kann. Darüber hinaus gibt es spezielle Verfahren, die auf die Eliminierung unbekannter Größen gerichtet sind. So ist es in manchen Fällen möglich, durch gezielte Farbstoffmarkierung einzelne Komponenten zu selektieren – auf Grundlage der Messung von $c(r)$ als $A(r)$ (Anwendungen z.B. in [30] [56] [160]). Ein anderes Beispiel ist die in dieser Arbeit weiterentwickelte Technik der Dichtekompensation [100], womit der Beitrag eines Detergens zu $c(r)$ bzw. $A(r)$ gelöscht wird.

Standardauswertung:

Bei gegebenem Modell, d.h. bei gegebenen Boltzmannfunktionen mit unbekannter Amplitude $c_i(r_0)$ bzw. $A_i(r_0)$, wurde die Zusammensetzung des gemessenen $A(r)$ -Profils üblicherweise durch Anpassung der Boltzmannfunktionen an selbiges ermittelt – mit den einzelnen $A_i(r_0)$ als Fitparameter. Zur Beurteilung der Güte einer Anpassung wurde die Summe der Fehlerquadrate, σ , herangezogen: Die beste Anpassung ist dadurch gekennzeichnet, daß die Fehlerquadratsumme minimal ist. Um die aus den Anpassungsrechnungen gewonnenen Absorptionsangaben vergleichbar zu machen, also unabhängig vom (beliebigen) Bezugspunkt r_0 , wurden via Integration der einzelnen Boltzmannverteilungen über das gesamte Probenvolumen die mittleren Absorptionen/ Konzentrationen der einzelnen Komponenten berechnet. Hierfür ist die Kenntnis der Positionen von Meniskus und Boden nötig, wobei die Bestimmung der Bodenposition üblicherweise von größerer Unsicherheit behaftet ist als die Meniskusbestimmung.

Die Anzahl auflösbarer Komponenten wird vom Rauschbeitrag des Datensatzes beschränkt und hängt davon ab, wie weit sich einzelne Parameter durch die übrigen ersetzen lassen. Diese

Frage kann wie folgt beantwortet werden: Jeweils ein Parameter des zugrundeliegenden Modells wird abweichend von seinem Wert aus der besten Anpassung fest vorgegeben und die Fehlerquadratsumme mit den restlichen – freien – Parametern minimiert. Der Anstieg der minimalen Fehlerquadratsumme im Verhältnis zur Differenz zwischen suboptimalem und optimalem Parameterwert ist ein Maß für die Genauigkeit, mit der eine Aussage über den Parameter zu treffen ist. Zur graphischen Darstellung dieses Auflösungsvermögens kann zu jedem vorgegebenen Wert eines Parameters das minimale σ aufgetragen werden. Dabei entstehen parabelähnliche Graphen, die scharf sind, wenn das Problem gut konditioniert ist, und flach, wenn die einzelnen Komponenten in hohem Maße austauschbar sind. Anhand dieser Graphen können nun Konfidenzintervalle festgelegt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde davon ausgegangen, daß ein Parameter signifikant in dem Intervall liegt, in dem die Fehlerquadratsumme um 0-10% vom optimalen Wert abweicht. [120] [124] [126]

Die „Parabeln“ des beschriebenen Verfahrens sowie die Vertrauensgrenze sind lediglich zur Beurteilung der Konsequenzen statistischer Fehler vorgesehen, sie geben keinen Aufschluß über Modellfehler. Um diese aufzuspüren, sind mit verschiedenen denkbaren Modellen Anpassungsrechnungen durchzuführen und die jeweils minimalen Fehlerquadratsummen bzw. die einzelnen Anpassungs-Residuen zu vergleichen. Eine systematische Verteilung der Residuen über r verweist auf ein fehlerhaftes Modell. Hierbei ist allerdings im Auge zu behalten, daß Fehler an den Quarzfenstern oder im optischen System ebenfalls eine systematische Residuenverteilung erzeugen können.

Die Berücksichtigung der Basislinie eines anzupassenden $A(r)$ -Profils erfolgte durch einen zusätzlichen Fitparameter mit der Masse „0“ (bzw. „1“, womit das Auswerteprogramm stabiler läuft). Damit wurde die Datenanalyse zwar durch einen weiteren Parameter belastet, weswegen sich die einzelnen Komponenten schlechter diskriminieren ließen. Die durch die Basislinie ohnehin erzeugte Unsicherheit wurde damit aber bei der Anpassungsrechnung mitberücksichtigt und konnte aus der Verbreiterung der Fehlerquadratsummen-„Parabeln“ unmittelbar abgelesen werden. Die zeitversetzt zum Sedimentationsgleichgewicht gemessene experimentelle Basisabsorption (s.o.), die im Fall ihrer zeitlichen Änderung (hervorgerufen z.B. durch sukzessive Oxidation von Thiolen) zu Fehlern führt, diente nur zur Kontrolle.

Alternativauswertung:

Eine alternative Auswertung gemessener Absorptions- bzw. Konzentrationsprofile beruht auf einer $\ln c$ -gegen- r^2 -Auftragung von Gleichung 23, sie liefert ortsabhängige gewichtsmittlere effektive Molmassen $\langle M_{\text{eff,W}} \rangle$:

$$\frac{d(\ln c_{\text{ges}}(r))}{dr^2} = \frac{\omega^2}{2RT} \frac{\sum_{i=2}^n M_i (1 - \bar{v}_i \rho) c_i(r)}{\sum_{i=2}^n c_i(r)} = \frac{\omega^2}{2RT} \langle M_{\text{eff,W}} \rangle(r) \quad \text{mit } M_{\text{eff}} = M(1 - \bar{v} \rho).$$

Für den abschließenden Schritt ist es nun erforderlich, daß alle \bar{v}_i gleich sind. Ist diese Voraussetzung nicht gegeben, so sind die partialspezifischen Volumina gleichzusetzen, wobei die Molmassen entsprechend korrigiert werden müssen:

$$\bar{v}_i \rightarrow \bar{v}^* \Rightarrow M_i (1 - \bar{v}_i \rho) = M_i^* (1 - \bar{v}^* \rho) = M_{\text{eff } i} \quad (M^* : \text{reduzierte Molmasse})$$

Sind alle partial-spezifischen Volumina gleich bzw. egalisiert, so erhält man aus $\langle M_{\text{eff,W}} \rangle$ die ortsabhängige gewichtsmittlere Molmasse $\langle M_W \rangle$:

$$\langle M_W \rangle(r) = \frac{\langle M_{\text{eff,W}} \rangle(r)}{(1 - \bar{v} \rho)} \quad \text{Gleichung 26}$$

In einem System mit $n \geq 3$ Komponenten ist diese Funktion streng monoton steigend. Im Spezialfall einer homogenen gelösten Substanz ($n = 2$) ist die gewichtsmittlere Molmasse ortsunabhängig.

Durch die Abstraktion eines Konzentrationsprofils auf lokale Molmassenmittelwerte geht Information verloren. Dafür erteilt diese Art der Auswertung unmittelbar Auskunft darüber, ob eine Probe homogen oder heterogen ist. Im heterogenen Fall erlaubt dieses Verfahren darüber hinaus, bei entsprechendem Vorwissen, die Identifizierung von Komponenten. Im Falle einer selbstassoziiierenden Substanz schließlich folgt wegen der lokalen Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes, daß die über die Komponenten des Assoziationssystems gemittelte Molmasse für eine bestimmte lokale Gesamtkonzentration der Substanz einen festen Wert einnimmt – unabhängig von der Rotordrehzahl und der Gesamtkonzentration – wodurch in einfachen Fällen die Möglichkeit gegeben ist, das Vorliegen eines Assoziationsgleichgewichts zu erkennen.

Software zur Datenbearbeitung und -analyse: „XL-A version 1.00“ von Beckman Instruments und „DISCREEQ version 3.0“ von Peter Schuck.

4 Ultrazentrifugenuntersuchung integraler Membranproteine

Integrale Membranproteine sind gesondert zu betrachtende Objekte von Zentrifugenuntersuchungen, da sie von Natur aus nicht in wässriger Lösung, sondern in einer für analytische Ultrazentrifugation völlig ungeeigneten Form vorliegen. Somit ist eine spezielle Vorbereitung des Probenmaterials gefordert: Das interessierende integrale Membranprotein ist unter Beibehaltung seines nativen Zustandes aus einer Lipiddoppelschicht in ein für die Analyse geeignetes wässriges Milieu zu übertragen. Diese Aufgabe erfordert in aller Regel den Einsatz nichtionischer Detergenzien. Die darausfolgende Anwesenheit von Detergens bei der Zentrifugenuntersuchung führt allerdings zu Schwierigkeiten bei der Interpretation der resultierenden Daten, die es zu bedenken und zu beherrschen gilt.

4.1 Präparation

4.1.1 Präparationsmittel Detergens

Detergentien sind wasserlösliche amphiphile Moleküle, die in der Lage sind, Bestandteile biologischer Membranen in wässrige Lösung zu bringen. Man unterscheidet zwischen anionischen, kationischen, zwitterionischen und nichtionischen Detergenzien, wobei in der vorliegenden Arbeit der Blick auf letztere gerichtet ist, da sie im Unterschied zu den ionischen Detergenzien „mild“ sind, also – in den meisten Fällen – Proteine nicht denaturieren (die für die vorliegende Arbeit entscheidenden nichtionischen Detergenzien und einige ihrer Eigenschaften sind in *Tabelle 4-1* aufgelistet; für Details zu den Themen „Detergenzien“ und „Detergens-Protein-Interaktion“ sei auf [50], [51], [88] oder [139] verwiesen).

Viele handelsübliche Detergenzien sind chemisch unrein: Sie enthalten z.T. undefinierte Additive, deren Gehalt von Charge zu Charge unterschiedlich sein kann. Darüber hinaus sind zahlreiche handelsübliche nichtionische Detergenzien heterogen, z.B. wegen polydispenser „Kopf“-Gruppen (hydrophiler Gruppen) aufgrund statistischer Polymerisierungsverfahren (die entsprechende, vom Hersteller angegebene chemische Bezeichnung ist nicht exakt, sondern charakterisiert einen Mittelwert).

Physikalische Eigenschaften von Detergenslösungen:

Gibt man eine geringe Menge eines gegebenen Detergens in Wasser, so bildet ein Teil des Detergens` eine einfache Schicht (Monolayer) an der Luft-Wasser-Grenze und senkt die

Oberflächenspannung, ein anderer Teil kann an die Gefäßoberfläche binden, während sich der Rest als einzelne Monomere in Lösung befindet. Zwischen Monolayer und Monomeren stellt sich ein Gleichgewicht ein, so daß – zunächst – die Oberflächenspannung eine Funktion der Detergenskonzentration ist. Ab einer bestimmten Detergenskonzentration (realiter handelt es sich um einen schmalen Konzentrationsbereich), der sog. kritischen Mizellenkonzentration (CMC, „critical micellar concentration“), läßt sich durch weitere Detergenzugabe die Monomerenkonzentration (praktisch) nicht mehr steigern, da sich zusätzliches Detergens spontan in „Mizellen“ organisiert (thermodynamisch kann dies als Phasentrennungsphänomen behandelt werden).

Eine Mizelle ist ein thermodynamisch stabiles kolloidales Aggregat von sphärischer bis ellipsoider Form [85], in dem amphiphile Moleküle so zusammengeschlossen sind, daß deren hydrophobe Teile ins Aggregatinnere weisen, während die Kopfgruppen den Kontakt zur wäßrigen Umgebung herstellen (in hydrophober Umgebung bilden sich „inverse“ Mizellen). Durch die Bildung derartiger in Wasser gelöster Aggregate sind Detergenzien makroskopisch betrachtet in hohem Maße wasserlöslich.

Bei gegebenem Detergens ist die Bildung von Mizellen nur möglich oberhalb einer bestimmten Temperatur, der „kritischen Mizellentemperatur“ (bei einer tieferen Temperatur bilden sich ab einer bestimmten Detergenskonzentration Flüssigkristalle). Bei nichtionischen Detergenzien liegt die kritische Mizellentemperatur allerdings meist unterhalb von 0°C, so daß sie im Zusammenhang mit der Behandlung von Membranproteinen keine Rolle spielt. [51]

Die kritische Mizellenkonzentration ist abhängig vom Verhältnis zwischen hydrophilem und hydrophobem Anteil am Molekül einer Detergenssorte, d.h. vom „HLB-Wert“ (HLB: hydrophile-lipophile balance): Mit zunehmender Hydrophobizität sinkt die CMC. Bei nichtionischen Detergenzien ist die CMC merklich von der Temperatur abhängig (zwischen 0°C und 37°C): Steigt die Temperatur, sinkt die CMC. Dagegen beeinflussen Ionenstärke und pH-Wert die CMC nichtionischer Detergenzien wenig bzw. nicht (generell hängen die Eigenschaften von Mizellen nichtionischer Detergenzien kaum vom pH-Wert ab). [51] [176]

Tabelle 4-1

Detergens	Molmasse (Monomer)	CMC [% (w/v)]	CMC-Bedingungen (Salzgehalt, Temperatur)	Bemerkungen
C ₁₂ E ₉ (Thesit)	583 Da	0,004 – 0,006	0 – 100 mM Na ⁺ 20 – 25°C	polydispers, Peroxid-gereinigt
Triton X-100 (reduziert)	631 Da	0,016	50 mM Na ⁺ 20 – 25°C	polydispers
DDM	511 Da	0,005 – 0,008	0 – 200 mM Na ⁺ 20 – 25°C	monodispers
LDAO (pH > 7)	229 Da	0,023 – 0,069	50 mM Na ⁺ 20 – 25°C	monodispers, bei pH < 7 kationisch

Quellen [Stand 03-2002]: URL: <http://www.embl-heidelberg.de/~gohlke/properties.html>
 URL: <http://strucbio.biologie.uni-konstanz.de/det/>
 URL: <http://psyche.uthct.edu/shaun/SBlack/detergnt.html>

Detergensmischungen:

Mischt man zwei verschiedene Detergenzien, Detergens A und Detergens B, und löst die Mischung in Wasser, bilden sich oberhalb einer bestimmten Gesamtdetergenskonzentration aus A und B zusammengesetzte Mizellen. Ein derartiges System – gemischte Mizellen im Gleichgewicht mit den Monomeren von A und B – läßt sich näherungsweise wie ein Flüssigkeitsgemisch im Gleichgewicht mit der Gasphase beschreiben, so daß im Falle idealen Mischungsverhaltens nach dem Raoult'schen Gesetz gilt (vgl. [51]):

$$C_A^{\text{Mon}} / C_B^{\text{Mon}} = C_A^{\text{Miz}} / C_B^{\text{Miz}} \cdot \text{CMC}_A / \text{CMC}_B$$

(mit $C_{A,B}^{\text{Mon,Miz}}$: Stoffmengenkonzentration von A bzw. B, als Monomer bzw. in Mizellen vorliegend; $\text{CMC}_{A,B}$: CMC des reinen Detergens A bzw. B)

Hieraus folgt unter anderem, daß das Detergens mit der im Reinzustand höheren CMC in der „Monomerphase“ im Vergleich zur „Mizellenphase“ angereichert ist.

Mischt man nun ein Detergens mit einem Lipid, erhält man in Wasser bei geringer Lipidkonzentration und mäßiger Detergenskonzentration ebenfalls gemischte Mizellen, deren Lipidkomponente im Falle erhöhter Lipidkonzentration allerdings im Gleichgewicht mit einer Bilayerphase steht. Daraus läßt sich nun umgekehrt die Wirkung von Detergenzien auf Lipidmembranen charakterisieren: Lipide werden aus der Membran in wäßrige Lösung überführt, indem sie in Detergensemizellen integriert werden. Diesen Vorgang nennt man **Solubilisation**. Er setzt voraus, daß die Detergenskonzentration die CMC des Detergens übersteigt.

4.1.2 Solubilisation und Aufreinigung

Solubilisation:

Die Solubilisation biologischer Membranen ist aufgrund von deren Heterogenität sehr komplex. So findet der Übergang eines integralen Membranproteins von der Lipiddoppelschicht in eine Protein-Detergens-Mizelle über das Zwischenstadium eines Protein-Lipid-Detergens-Aggregats statt [139]. Dabei ist unter Umständen das Endstadium der Protein-solubilisation mit dem Begriff „Protein-Detergens-Mizelle“ unzureichend beschrieben: Es gibt Hinweise darauf, daß die am Protein-Detergens-Komplex beteiligten Detergensmonomere weniger eine mizellare Umgebung, denn eine an die (hydrophobe) Proteinoberfläche bindende Schicht bilden [85].

Ionische Detergenzien sind im Allgemeinen den nichtionischen hinsichtlich der Effektivität der Solubilisation, der „Solubilisationskraft“, überlegen. Allerdings wirken sie in den meisten Fällen denaturierend, was unter anderem darauf zurückzuführen sein dürfte, daß sie nicht nur mit den lipophilen Teilen eines amphiphilen integralen Membranproteins in Kontakt treten, sondern auch – über die Kopfgruppen der Monomere – an hydrophile Teile binden (verschärfend kommt hinzu, daß die CMC ionischer Detergenzien wegen deren niedrigerer Hydrophobizität vergleichsweise hoch ist). Nichtionische Detergenzien dagegen erhalten tendenziell den Zustand eines amphiphilen Proteins: Sie bilden dessen natürliche hydrophobe Lipidumgebung nach, in der Regel ohne den Protein-Wasser-Grenzbereich zu stören. Insbesondere erhalten sie in vielen Fällen die Quartärstruktur des Proteins, d.h. sie zerstören häufig selbst schwache Wechselwirkungen zwischen Polypeptiden nicht [51] [138]. Damit ist der Einsatz nichtionischer Detergenzien die überlegene Methode, integrale Membranproteine in wäßrige Lösung zu überführen (Alternativen wie die sog. Amphipole [145] haben sich bisher nicht durchgesetzt; allerdings dürften die sehr proteinschonenden kurzkettigen Lipide an Bedeutung gewinnen [65]).

Gewisse – milde – nichtionische Detergenzien wie C₁₂E₉ oder Triton können sich allerdings zu denaturierenden Agenzien wandeln: Durch den Einfluß von molekularem Sauerstoff bilden sich Peroxide, starke Oxidationsmittel, wobei die Zwischenprodukte der Peroxidentstehung besonders reaktiv sind [90] [113] [156]. Deshalb ist erstens die Entfernung von Peroxiden bzw. der Erwerb Peroxid-bereinigter Detergenzien zu empfehlen, zweitens ist die O₂-Konzentration in der Umgebung des Proteins zu minimieren (durch „Entgasen“ der Präparationspuffer sowie durch Spülen der Probenlösung mit N₂; s. [37]).

Aufreinigung:

Die weitere Behandlung eines solubilisierten Membranproteins, die Aufreinigung und Überführung in einen für die Zentrifugenanalyse geeigneten Puffer, muß ebenso wie die Solubilisierung in Gegenwart von (nichtionischem) Detergens stattfinden, da andernfalls das Protein aggregiert – üblicherweise zu einem undefinierten großen Aggregat bis hin zu einem amorphen Präzipitat – und seinen ursprünglichen Zustand verliert [51].

Auch während der Aufreinigung und Untersuchung muß die Detergenskonzentration über der CMC liegen [18]. Im Prinzip ist sie deutlich entfernt von der CMC zu wählen, da Detergens aufgrund von Adsorption an Wänden von Probengefäßen, Teflonschläuchen, EPON-Mittelstücken etc. verloren gehen kann. Unabhängig davon kann die Stabilität eines Proteins auf einen Detergensgehalt angewiesen sein, der die CMC um ein vielfaches übersteigt, wie Erfahrungen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Schubert mit dem Bande 3-Protein zeigen. In manchen Fällen ist ein Detergensgehalt weit entfernt von der CMC allerdings schädlich, wie am Beispiel des bc_1 -Komplexes deutlich wird, der bei höheren Detergenskonzentrationen seine Quartärstruktur einbüßt (s.u.).

Damit gilt die Regel, daß nach der Solubilisierung, die für gewöhnlich relativ viel Detergens erfordert, der Detergensgehalt zu senken ist, ohne in den Bereich der CMC zu geraten.

4.1.3 Anforderungen an das Präparat

Die wesentliche Voraussetzung für die Ultrazentrifugenanalyse eines integralen Membranproteins ist mit der Solubilisierung bereits erfüllt: Das Vorliegen des Untersuchungsobjekts in wäßriger Lösung. In nachfolgenden, gegebenenfalls in vorhergehenden Präparationsschritten sind weitere Anforderungen zu erfüllen, die die Untersuchungsmethode an das Präparat stellt:

- Im Falle von Ultrazentrifugenuntersuchungen, die auf einer Absorptionsoptik beruhen, muß das Protein im UV- oder sichtbaren Bereich deutlich absorbieren. Ist dies nicht der Fall, bzw. wird die Absorption von anderen – notwendigen – Lösungsbestandteilen (z.B. von Ascorbinsäure oder von Detergenzien wie Triton X-100) zu sehr überlagert, ist das Protein mit einem geeigneten Farbstoff zu markieren. Bei den Atmungskettenenzymen bc_1 -Komplex und Cytochrom *c*-Oxidase ist eine Farbstoffmarkierung natürlicherweise in Form der assoziierten Häm-Gruppen gegeben. Bande 3 läßt sich, wie die meisten Proteine, im UV-Bereich messen. Für den hier nicht vorliegenden Fall einer Untersuchung von Bande 3 in Gegenwart von im UV-Bereich stark absorbierenden Additiven wie Ascorbin-

säure existiert ein schonendes und dennoch sehr effektives Verfahren, das Protein mit FITC⁴ zu markieren [83].

- Die Proteinkonzentration muß hoch genug sein, um das Protein mit der Absorptionsoptik zu „sehen“. Sie muß andererseits so niedrig sein, daß die Voraussetzung einer ideal verdünnten Proteinlösung quasi erfüllt ist. Darüber hinaus ist die Konzentration so zu wählen, daß während der Messung die Gesamtaborption bei der gewünschten Meßwellenlänge die von der Optik der Optima XL-A gesetzte Grenze der Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes nicht überschreitet (gegebenenfalls muß die Meßwellenlänge variiert werden).
- Pufferzusätze, die bei der Meßwellenlänge absorbieren, sollten vor der Analyse entfernt oder auf ein notwendiges Minimum reduziert werden, um die Basislinie und die damit verbundene Unsicherheit zu minimieren.
- Die Ionenstärke des Puffers, in dem das Protein untersucht werden soll, muß ausreichend sein, um von Ladungseffekten verursachtes nichtideales Sedimentationsverhalten auszuschließen (50 mM NaCl sind üblich, um diesen Zweck zu erfüllen; meist reichen 10 mM).
- Das Protein muß weitgehend von anderen Bestandteilen der natürlichen Umgebung getrennt sein. Mindestens 95% der Absorption des sedimentierenden Materials sollten vom Untersuchungsobjekt stammen [90].
- Insbesondere für Gleichgewichtsläufe ist es nötig, daß das Protein über viele Stunden hinweg seinen Zustand beibehält, eine Forderung, die die Wahl des Detergens erheblich einschränken kann (s.u.). Die Stabilität eines Präparats kann häufig durch den Einsatz von Saccharose oder Glyzerin erhöht werden [12] [19] [42] [43] [44] [60] [70].

4.2 Analyse

4.2.1 Störfaktor Detergens

Wird nun ein Präparat, das die genannten Anforderungen erfüllt, einer Ultrazentrifugenuntersuchung unterzogen, so sedimentiert nicht nur das interessierende Protein, sondern auch das Detergens – in zweifacher Form: als freie Mizelle und proteingebunden.

⁴ FITC: Fluorescein-Isothiozyanat (Isomer I).

- Der Beitrag freier Mizellen zum Sedimentationsprofil hängt bei gegebener Detergenskonzentration von der Mizellengröße, von der Massendichte des Detergens und von seiner optischen Dichte (bei gegebener Meßwellenlänge) ab. Letztere ist meist schwer kontrollierbar, da sie durch Einlagerung kleiner absorbierender Moleküle (DTT, Proteinfragmente, Pigmente) variieren kann [36]. Damit stören freie Mizellen prinzipiell die Ultrazentrifugenanalyse, da sie eine unbekannte Größe darstellen, die Berücksichtigung erfordert (im Falle der Vernachlässigbarkeit der Mizellen ist diese nachzuweisen), ohne per se von Interesse zu sein.
- Proteingebundenes Detergens wirkt sich auf das Sedimentationsprofil unmittelbar dadurch aus, daß es das Sedimentationsverhalten des Proteins verändert: Die effektive Molmasse des gebundenen Detergens, $M_{D,eff} = M_D (1 - \bar{v}_D \rho)$, addiert sich mit derjenigen des Proteins, $M_{P,eff} = M_P (1 - \bar{v}_P \rho)$, zur effektiven Molmasse des Protein-Detergens-Komplexes, $M_{PDK,eff} = M_{PDK} (1 - \bar{v}_{PDK} \rho)$.⁵ Damit ist für eine korrekte Interpretation von Sedimentationsprofilen eines Protein-Detergens-Komplexes die Kenntnis sowohl der Molmasse der Detergenschülle (M_D) als auch des partialspezifischen Volumens des Detergens (\bar{v}_D) erforderlich. Die Bestimmung von \bar{v}_D stellt kein ernsthaftes Problem dar, die auf die Proteinmenge bezogene Menge des proteingebundenen Detergens kann jedoch – wenn überhaupt – nur unter erheblichem Aufwand und/ oder mit großem Meßfehler ermittelt werden [85] [118].

4.2.2 Dichtekompensation

Der Beitrag des für das Präparat notwendige, für die Analyse jedoch hinderliche Detergens kann eliminiert werden, indem man die Dichte des Puffers, ρ , und die Detergensedichte, genauer: das reziproke partialspezifische Volumen des Detergens, experimentell angleicht:

$$\bar{v}_D \rho = 1 \Rightarrow M_{D,eff} = 0 \Rightarrow M_{PDK,eff} = M_{P,eff}.$$

Diese Gleichsetzung nennt man **Dichtekompensation**. Das Detergens wird gegenüber dem Zentrifugalfeld transparent, es „schwebt“ – unabhängig davon, ob es proteingebunden oder frei ist, da man praktisch davon ausgehen kann, daß das partialspezifische Volumen freier Mizellen identisch ist mit demjenigen gebundener. [100]

⁵ Effektive Molmasse: die um den Auftriebsterm korrigierte Molmasse, worauf die radiale Beschleunigung „effektiv“ wirkt.

Dichtekompensation wurde in der Vergangenheit im Wesentlichen praktiziert durch Anreicherung eines Puffers mit D_2O und/ oder $D_2^{18}O$ [99] [100] [113] [118], wobei man heutzutage mangels Verfügbarkeit von $D_2^{18}O$ auf ersteres beschränkt ist. Die Grenzen dieses Verfahrens sind ersichtlich: Es können nur Detergendsichten, die kleiner sind als die D_2O -Dichte, kompensiert werden (nebenbei ist eine von der D_2O -Konzentration abhängige Deuterierung des Proteins zu berücksichtigen).

Ein anderer Ansatz, Detergendsichten zu kompensieren, wurde von der Arbeitsgruppe Rosenbusch verfolgt [75]: Aus einem polydispersen nichtionischen Detergens wurden Detergensbestandteile isoliert, die in etwa die Dichte von Wasser aufweisen. Dieses „maßgeschneiderte“ Detergens ist allerdings nur für wenige Proteine geeignet.

In Sedimentationsgleichgewichtsuntersuchungen integraler Membranproteine stellen effektive Molmassen die einzigen Unbekannten dar. Im Rahmen dieser Analysemethode leistet Dichtekompensation somit die Eliminierung des Beitrags von freiem wie von proteingebundenem Detergens. Bei Sedimentationsgeschwindigkeitsanalysen beschränkt sich der Nutzen der Dichtekompensation auf das Eliminieren freier Mizellen (deren s -Wert verschwindet; s. *Gleichung 16*). Denn die Wirkung von gebundenem Detergens ist trotz $M_{D,eff} = 0$ nicht verschwindend: Der Reibungskoeffizient des Protein-Detergens-Komplexes unterscheidet sich in gegebenem Puffer von demjenigen des – hypothetischen – detergensfreien Proteins. Aus *Gleichung 16* folgt, daß sich damit auch die s -Werte unterscheiden.

Ausblick:

Aufgrund der erheblichen Vorteile von Dichtekompensation ist es wünschenswert, dieses Prinzip für möglichst viele nichtionische Detergenzien anwendbar zu machen und das Spektrum der Dichtekompensationsverfahren entsprechend zu erweitern – mit dem Ziel, Ultrazentrifugenuntersuchungen an integralen Membranproteinen unabhängig von der Wahl des Detergens` und damit unter biochemisch optimalen Bedingungen durchführen zu können. Dies würde manche Untersuchung verbessern bzw. überhaupt ermöglichen, die gegenwärtig noch an der Differenz zwischen biochemischem und physikalisch-methodischem Optimum leidet bzw. scheitert.

5 Neue Methoden zur Kompensation der Schwimmdichte von Detergensmizellen

Die im vorangegangenen Kapitel erwähnten Schranken der etablierten Verfahren zur Dichtekompensation von Detergensmizellen – insbesondere deren Untauglichkeit für Detergentien mit hoher Dichte – sind ausreichend Motiv für die Entwicklung verbesserter bzw. neuer Kompensationsmethoden, wovon im Folgenden einige vorgestellt werden. Diese lassen sich in zwei Gruppen einteilen, entsprechend zweier entgegengesetzter Herangehensweisen zur Angleichung von Lösungsdichte und Detergensdichte: Entweder man erhöht die Dichte der Lösung bis zur Schwimmdichte der Detergensmizellen, hier z.B. durch Zugabe von Saccharose oder Glycerin, in Anlehnung an das herkömmliche Kompensationsverfahren, bei dem D_2O und/ oder $D_2^{18}O$ zugesetzt werden. Oder man konstruiert eine Detergensmizelle, deren Dichte einer gegebenen Lösungsdichte angepaßt ist, hier verwirklicht durch geeignetes Mischen von LDAO, einem Detergens mit einer Dichte $\rho < 1$ g/ml, und $C_{12}E_9$ ($\rho > 1$ g/ml).

Die Erarbeitung der neuen Methoden, die z.T. in der Vergangenheit bereits in Erwägung gezogen oder ansatzweise eingesetzt wurden [99] [113] [114], erfolgte in zwei Schritten: Zunächst wurden die Bedingungen ausfindig gemacht, unter denen Dichtekompensation gegeben ist – durch Messung der effektiven Molmasse der Mizelle in Abhängigkeit von der Konzentration des dichtesteigernden Zusatzes bzw. in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis zwischen LDAO und $C_{12}E_9$. Im zweiten Schritt wurde überprüft, ob bzw. wie weit diese Bedingungen für Ultrazentrifugenuntersuchungen an Membranproteinen geeignet sind. Hierzu wurde das Verhalten eines robusten (insbesondere zeitlich stabilen) einheitlichen integralen Membranproteins mit bekannter Quartärstruktur bzw. Molmasse im Sedimentationsgleichgewicht unter den verschiedenen neuen Kompensationsbedingungen analysiert und das Ergebnis verglichen mit der Sedimentationsgleichgewichtsanalyse des Proteins unter dem gängigen Verfahren der Dichtekompensation mittels D_2O .

Die Wahl des „Testproteins“ fiel auf die Cytochrom *c*-Oxidase von *Paracoccus denitrificans*, ein integrales Membranprotein der Atmungskette. Das von der Arbeitsgruppe Prof. Ludwig (Institut für Biophysikalische Chemie und Biochemie, JWG-Universität Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellte Cytochrom *c*-Oxidase-Präparat erfüllte nachweislich die an ein Testprotein gestellten Anforderungen.

Die an der Cytochrom *c*-Oxidase durchgeführte Überprüfung der neuen Methoden zur Anpassung der Lösungsichte an die Mizellendichte ergab, daß man Detergensdichten, die mit D₂O kompensiert werden können, ebenso gut (d.h. ohne Korrekturbedarf) mit Saccharose oder Glycerin kompensieren kann, will man Membranproteine unter der Bedingung der Dichtekompensation im Sedimentationsgleichgewicht untersuchen. Deutlich höhere Detergensdichten liegen zwar ebenfalls in der Reichweite von Glycerin und insbesondere von Saccharose, allerdings um den Preis erstens einer systematischen Abweichung im Meßergebnis, die eine Korrektur nötig macht, und zweitens einer starken Verlängerung der Dauer des Experiments.

Die Untersuchung der Cytochrom *c*-Oxidase in Gegenwart der LDAO-C₁₂E₉-Mischung zeigte schließlich, daß (auch) Dichtekompensation mittels „maßgeschneiderter“ Mizellen eine vollwertige Alternative zu den herkömmlichen Kompensationsverfahren sein kann.

5.1 Methoden zur Ermittlung und Herstellung von Kompensationsbedingungen

Um die Kompensationsbedingung $M_{D,eff} = 0$ herzustellen, muß entweder die Pufferdichte ρ an die Mizellendichte angepaßt werden („ $\rho \rightarrow = 1/\bar{v}_D$ “), oder die Mizellen müssen auf eine gegebene Lösungsichte hin zugeschnitten werden („ $\bar{v}_D \rightarrow = 1/\rho$ “).

Zu „ $\rho \rightarrow = 1/\bar{v}_D$ “:

Da die meisten Detergenzien eine höhere Dichte als Wasser besitzen – LDAO⁶ bildet eine Ausnahme – beruhen sowohl die etablierten als auch die im Folgenden ausgearbeiteten Verfahren der Lösungsichteanpassung „ $\rho \rightarrow = 1/\bar{v}_D$ “ auf der Anreicherung der Lösung mit Substanzen, die die Dichte erhöhen. In dieser Arbeit kamen D₂O, Saccharose und Glycerin als dichtesteigernde Additive („Densifier“) zum Einsatz. Die drei nichtionischen Detergentien, die hier gewählt wurden, um für ihre Mizellen die Kompensationsbedingungen unter Einsatz der genannten Densifier zu ermitteln, C₁₂E₉⁷, rTX-100⁸ und DDM⁹, werden in der Biochemie standardmäßig verwendet, sie gelten als „milde“,

⁶ LDAO: Lauryldimethylamin-n-Oxid

⁷ C₁₂E₉: Polyoxyäthylen 9 Laurylether

⁸ rTX-100: Triton X-100, reduzierte Form

⁹ DDM: n-Dodecyl- β -D-Maltosid

proteinschonende Detergenzien. Ihre Dichte steigt in der genannten Reihenfolge, wobei lediglich die C₁₂E₉-Dichte ohne Schwierigkeiten auf die etablierte Art und Weise – durch Ersatz einer entsprechenden Menge H₂O durch D₂O [100] – kompensiert werden kann.

Die Konzentrationen der dichtesteigernden Additive, die unter gegebenen Umständen wie Temperatur, sonstiger Pufferzusammensetzung oder Detergens (-charge) die Bedingung $M_{D,eff} = 0$ erfüllen, wurden wie folgt ermittelt: Es wurde eine Reihe detergentshaltiger Pufferlösungen hergestellt, die sich lediglich hinsichtlich der Konzentration des jeweiligen Densifiers unterschieden. In einem Fall wurden zwei Densifier, D₂O und Saccharose, kombiniert, wobei das D₂O/H₂O-Verhältnis vorgegeben und nur der Saccharose-Gehalt variiert wurde (zur Herstellung der Lösungen s. *Anhang 2*). Unter für alle Lösungen gleichen äußeren Bedingungen (insbesondere Temperatur) wurde mittels Sedimentationsgleichgewichtsanalyse $M_{D,eff}$ in den verschiedenen Lösungen bestimmt und gegen die Konzentration des Densifiers bzw. gegen die Lösungsdichte aufgetragen. Diese Plots ergaben nach Extra- bzw. Interpolation auf $M_{D,eff} = 0$ die gewünschte Densifierkonzentration.

Zu „ $\bar{v}_D \rightarrow = 1/\rho$ “:

Hier stellte sich die Aufgabe, ein häufig benutztes nichtionisches Detergens mit einer Dichte $\rho < 1$ g/ml, LDAO ($\rho(\text{LDAO}) = 0,93$ g/ml [118]), so mit einem anderen Detergens zu mischen, daß die resultierenden Misch-Mizellen schwebten. Als zweites Detergens wurde C₁₂E₉ benutzt. Wie noch nachzuweisen sein wird, verhalten sich geeignet gemischte Mizellen im Rahmen der Genauigkeit von Ultrazentrifugenuntersuchungen wie eine einheitliche Population.

Das LDAO-C₁₂E₉-Mischungsverhältnis, das zum „Schweben“ der gemischten Mizellen in einem bestimmten Puffer bei einer bestimmten Temperatur führt, wurde ähnlich zur obigen Vorgehensweise ermittelt: Es wurde eine Reihe von identischen Pufferlösungen hergestellt, in die anschließend soviel Detergens gegeben wurde, daß die Gesamtkonzentration an Detergens in jeder Lösung gleich war. Die Lösungen unterschieden sich lediglich in der Zusammensetzung des Detergens (und damit praktisch nicht in der Lösungsdichte). Die verschiedenen Lösungen wurden unter identischen äußeren Bedingungen im Sedimentationsgleichgewicht untersucht. Die effektive Molmasse der Mizellen wurde für jede Lösung bestimmt und gegen das LDAO-C₁₂E₉-Mischungsverhältnis (ausgedrückt als $m(\text{LDAO})/m(\text{LDAO}+\text{C}_{12}\text{E}_9)$ in % (w/w); m: Masse) aufgetragen. Durch Extra- bzw. Interpolation ergab sich daraus das Mischungsverhältnis, das die Bedingung $M_{D,eff} = 0$ erfüllt.

Zur Untersuchung der Detergensmizellen in der analytischen Ultrazentrifuge wurden die Probensektoren der 6-Kanal-Mittelstücke mit 135-140 μl der entsprechenden detergenshaltigen Pufferlösung gefüllt. Es wurden Sedimentationsgleichgewichtsläufe bei einer Rotordrehzahl von 40 000 Upm durchgeführt, gegebenenfalls zusätzlich bei 13 000, 15 000 oder 20 000 Upm. Rotortemperatur war 4°C, gegebenenfalls wurden zusätzlich Temperaturen zwischen 8°C und 20°C gewählt. Zur Interpretation der Gleichgewichtsprofile wurde zum einen angenommen, daß die Detergensmizellen eine einheitliche Substanz bilden (s. [51] und [139]), zum anderen, daß die Basislinie nicht nennenswert von null abweicht. Beide Annahmen wurden dadurch bestätigt, daß eine Anpassung der Profile mit einer einzigen (sedimentierenden ($M_{D,\text{eff}} > 0$), schwebenden ($M_{D,\text{eff}} = 0$) oder aufschwimmenden ($M_{D,\text{eff}} < 0$)) Komponente und einer Basislinie um 0 OD weder durch Hinzunahme einer weiteren Komponente, noch durch deutliche Basislinienvariation, noch durch eine Kombination aus beidem signifikant verbessert werden konnte. Dementsprechend wurde $M_{D,\text{eff}}$ wie folgt bestimmt: Ein Gleichgewichtsprofil wurde mit Basislinie und einer effektiven Molmasse angepaßt, wobei die Basislinie bis ca. $\pm 5\%$ der bei der Meßwellenlänge vorliegenden Gesamtabsorption und die effektive Molmasse ohne Beschränkung variiert wurde. Diejenige Kombination Basislinie/ effektive Molmasse, die zu einem Minimum der Fehlerquadratsumme führte, lieferte den Wert für $M_{D,\text{eff}}$.

Da die Optik der Optima XL-A ein zwischen 200 und 800 nm absorbierendes Untersuchungsobjekt benötigt und lediglich rTX-100 dieses Kriterium erfüllt, mußten C₁₂E₉, DDM und die LDAO-C₁₂E₉-Mischung mit einer absorbierenden Substanz markiert werden, um während der Ultrazentrifugenuntersuchung „sichtbar“ zu sein. Zur Markierung der Mizellen wurde DPH (1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien) verwendet, eine Substanz, die aufgrund ihrer hohen Hydrophobizität nahezu ausschließlich in den Mizellen anzutreffen ist und überdies die Eigenschaften der Mizellen, insbesondere ihre Dichte, nicht signifikant beeinflusst [118]. DPH ist ein bekannter „Fluorophor“, hier wird allerdings nicht die Fluoreszenz der Substanz, sondern ihre hohe spezifische Absorption benutzt.¹⁰ Zu beachten ist dabei die Lichtempfindlichkeit von DPH, so daß während der Präparation der DPH-haltigen Mizellen sowie während der Ultrazentrifugenuntersuchung dieser Präparate die Lichteinwirkung – und damit Anzahl und Dauer der Scans – auf das Notwendige zu reduzieren ist.

¹⁰ Unter den gewählten Bedingungen liegt das Absorptionsmaximum von DPH bei einer Wellenlänge von etwa 357 nm ($\epsilon_{\text{max}} : 80\,000\text{-}90\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).

Die Detergensmizellen wurden nach folgender Vorschrift mit DPH markiert:

In einen Rundkolben mit Glasschliff wurde das Detergens – C₁₂E₉ oder DDM oder LDAO plus C₁₂E₉ im gewünschten Mischungsverhältnis – eingewogen. Es wurden pro 1 g Detergens 0,5 mg DPH, in Chloroform gelöst, zugesetzt. Anschließend wurde reichlich Chloroform-Methanol-Mischung hinzugefügt, worin sich der Kolbeninhalt komplett löste (Chloroform/Methanol-Verhältnis: 2/1 (v/v)). Der Rundkolben wurde daraufhin an einen Rotationsverdampfer angeschlossen und in einem Wasserbad auf 30-40°C erwärmt. Nach der vollständigen Entfernung der organischen Lösungsmittel wurde im Kolben das Detergens-DPH-Gemisch durch Zugabe der gewünschten Pufferlösung in wässriger Umgebung gelöst, sodaß schließlich das Detergens entweder in einer Stammlösung oder in der vorgesehenen Endkonzentration vorlag.

Die markierten Mizellen wurden in der Ultrazentrifuge bei 357 nm, einem Absorptionsmaximum von DPH, beobachtet. Reduziertes Triton X-100, welches nicht markiert werden mußte, trotz seiner verglichen mit nichtreduziertem Triton niedrigen Absorption im Wellenlängenbereich um 280 nm, wurde bei 275 nm analysiert.

Das beschriebene Verfahren zur Vereinigung von Detergens und DPH wurde generell zur Herstellung von LDAO-C₁₂E₉-Mischungen angewendet, um die Bildung einheitlicher Misch-Mizellen sicherzustellen – sei es mit DPH, wie im Fall der Untersuchung der Mizellen, sei es ohne, wie im Falle der Untersuchung von Membranproteinen in Gegenwart der Detergens-Mischung.

Die Detergenzien – ob markiert oder unmarkiert, ob gemischt oder pur – wurden in wässriger Pufferlösung aufgenommen und (gegebenenfalls via Stammlösung) auf die für die Ultrazentrifugenuntersuchung vorgesehene Konzentration von 0,1% bis 0,5% (w/v) Detergens (im Falle der LDAO-C₁₂E₉-Mischung: Detergens insgesamt) eingestellt. Es wurden diejenigen Pufferbedingungen gewählt, die für die Untersuchung des Bande 3-Proteins üblich waren:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

50 mM NaCl

0,5 mM EDTA

Im Falle der Lösungsdichteanpassung wird diese Zusammensetzung durch den/ die Densifier ergänzt.

Die im Folgenden erarbeiteten Werte für diejenigen Densifierkonzentrationen bzw. LDAO-C₁₂E₉-Mischungsverhältnisse, die $M_{D,eff} = 0$ erfüllen, gelten prinzipiell nur für die jeweils

angegebenen Bedingungen. So sind Lösungsdichte und Mizellendichte von Temperatur und Pufferzusammensetzung abhängig, wobei der Temperatureinfluß mehr im Hinblick auf die Mizellendichte zu beachten ist. Es gab darüberhinaus Anhaltspunkte dafür, daß die Mizellendichte der nicht-einheitlichen Detergenzien C₁₂E₉ und rTX-100 – sie bestehen jeweils aus einer Mischung „ähnlicher“ Substanzen mit unterschiedlicher Kettenlänge (s. Kap. 4.1.1) – von Hersteller zu Hersteller bzw. bei gegebenem Hersteller sogar von Charge zu Charge etwas schwanken kann. Dagegen wirkte sich die Detergenskonzentration im oben angegebenen Konzentrationsbereich lediglich im Falle der LDAO-C₁₂E₉-Mischung auf die Mizellendichte aus.

Die Dichte von Lösungen wurde bei 4°C in einem Paar DMA 02 Densitometer (Anton Paar, Graz) gemessen. Die Viskosität von Lösungen wurde als kinematische Viskosität in einem Ubbelohde Viskosimeter Ref. Nr. 50101 (Schott, Hofheim a. Ts.) bei 4°C bestimmt.

5.2 Dichtekompensation ausgewählter nichtionischer Detergenzien

5.2.1 Dichtekompensation von C₁₂E₉

Die Schwimmdichte von C₁₂E₉-Mizellen sollte mittels Saccharose oder Glyzerin kompensiert werden. Zur Ermittlung der passenden Saccharose- bzw. Glyzerinkonzentration wurden 2 Reihen von Pufferlösungen hergestellt, mit folgender Zusammensetzung:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

50 mM NaCl

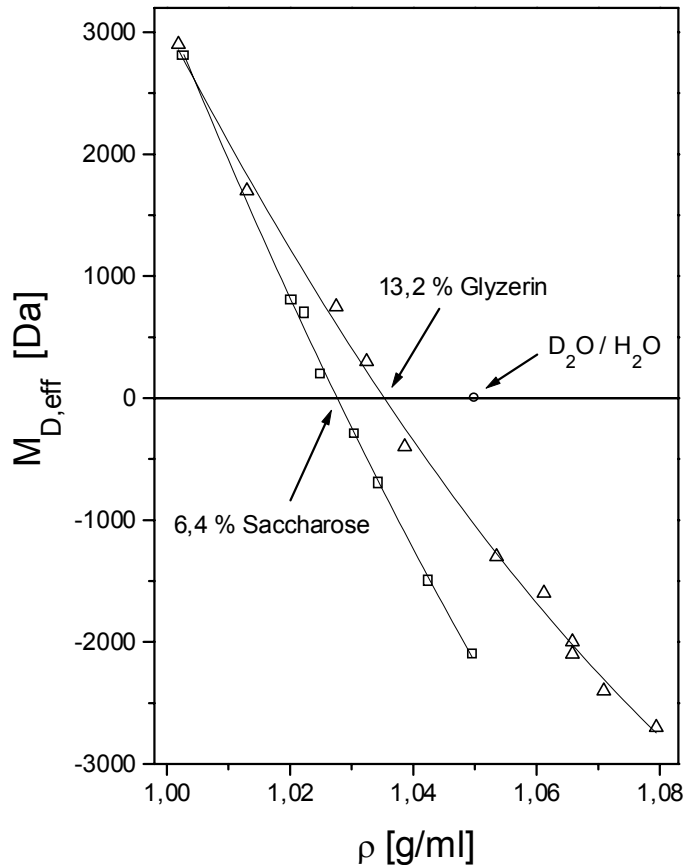
0,5 mM EDTA

0,3% (w/v) C₁₂E₉ (DPH-markiert)

X% (w/v) Saccharose (Reihe 1) **oder Y%** (w/v) Glyzerin (Reihe 2)

mit $0 \leq X \leq 12$ und $0 \leq Y \leq 30$

Die Ergebnisse der Ultrazentrifugenuntersuchung dieser Lösungen bei 4°C zeigt *Abbildung 5.1*. Aufgetragen ist $M_{D,eff}$ gegen die mittels Saccharose bzw. Glyzerin variierte Lösungsdichte ρ . Es zeigt sich, daß zur Herstellung der Bedingung $M_{D,eff} = 0$ entweder **6,4% (w/v) Saccharose** oder **13,2% (w/v) Glyzerin** notwendig sind. Zu Vergleichszwecken wurde die D₂O-Konzentration bestimmt, die ohne Einsatz von Saccharose oder Glyzerin die C₁₂E₉-Mizellen kompensiert; es ergab sich für $M_{D,eff} = 0$ ein **D₂O/H₂O-Verhältnis von 46/54 (v/v)**. Die diesem Verhältnis in der genannten Pufferlösung entsprechende Lösungsdichte ist ebenfalls in *Abbildung 5.1* dargestellt.



Ergebnis des Gleichgewichtslaufs mit 0,3% (w/v) $C_{12}E_9$ (DPH-markiert) in Pufferlösungen unterschiedlicher Saccharose- bzw. Glyzerinkonzentration bzw. in D_2O -haltigem Puffer. Aufgetragen ist die effektive Molmasse der $C_{12}E_9$ -Mizellen gegen die Lösungsdichte; die Dichtekompensation ergibt sich aus der Bedingung $M_{D,eff} = 0$.

Experimentelle Bedingungen: Rotordrehzahl 40000 Upm; Rotortemperatur 4°C; Meßwellenlänge 357 nm (Absorptionsmaximum von DPH). Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0-12% (w/v) Saccharose (\square) oder 0-30% (w/v) Glyzerin (Δ) oder 46% (v/v) D_2O (\circ).

$M_{D,eff} = 0$ wurde erfüllt durch 6,4% Saccharose ($\rho = 1,028$ g/ml) bzw. 13,2% Glyzerin ($\rho = 1,033$ g/ml) bzw. 46/54 D_2O/H_2O ($\rho = 1,050$ g/ml).

Die durchgezogenen Linien sind nichtlineare Anpassungen und dienen der Orientierung.

Abbildung 5.1

Wie sich aus *Abbildung 5.1* ergibt, ist die Lösungsdichte, welche die Mizellendichte egalisiert, eine Funktion der Lösungszusammensetzung: Mit Saccharose als Densifier beträgt die Kompensationsdichte **1,028 g/ml**, mit Glyzerin **1,033 g/ml** und mit D_2O **1,050 g/ml**. Die Differenzen sind offensichtlich weitaus größer als der (statistische) Meßfehler. Dieser Befund deutet darauf hin, daß an die Mizelle bevorzugt Wasser bindet, umgekehrt der Densifier Saccharose bzw. Glyzerin aus den an die Mizellenoberfläche angrenzenden Schichten verdrängt wird, wodurch im Bereich dieser Schichten ein Dichtegradient entsteht (eine Änderung der Mizellen-Packungsdichte in der beobachteten Größenordnung erscheint als thermodynamisch zu ungünstig). Damit wäre eine Detergensmizelle in Saccharose- bzw. Glyzerin-

lösung als Komplex aus einem Detergenspolymer und einer als Auftriebskörper wirkenden Hydrathülle zu betrachten (vgl. [77]; für Elektrolytlösungen kann nämlich es gelten; zu „preferential binding“ s. [42] [43] [144]). Für eine D₂O-Lösung dagegen ergibt dieselbe Betrachtungsweise ein anderes Bild: Da D₂O und H₂O gleichermaßen an die Oberfläche des Detergenspolymers binden (vgl. [100]) und damit das D₂O/H₂O-Verhältnis der oberflächennahen Schichten und dasjenige der gesamten Lösung identisch sind, wird die Dichte der Hydrathülle kompensiert. Demnach kommt die mit D₂O als (alleinigem) Densifier gemessene Kompensationsdichte der C₁₂E₉-Mizelle, $\rho = 1,05 \text{ g/ml}$, der Dichte des reinen Detergensanteils der Mizelle am nächsten; zumal H-D-Austausch im Falle von C₁₂E₉ keine Rolle spielt.

Die in *Abbildung 5.1* dargestellten Ergebnisse beruhen auf Zentrifugationen mit hoher Rotordrehzahl (40 000 Upm). Bei niedrigeren Drehzahlen sind die Sedimentations- bzw. Floatationsprofile flacher, was die Auswertegenauigkeit verringert. Andererseits besteht bei hohen Drehzahlen erstens die Gefahr, daß eine etwaige Druckabhängigkeit der Mizellenschwimmdichte angesichts der steilen Druckgradienten zwischen Probenmeniskus und -boden die Messung verfälscht. Zweitens können bei hohen Drehzahlen Additive wie Saccharose merklich sedimentieren, mit der Folge, daß sich ein (zwar flacher, aber) signifikanter Dichtegradient zwischen Probenmeniskus und -boden aufbaut. Deshalb wurden die Resultate aus *Abbildung 5.1* bei niedrigerer Drehzahl (20 000 Upm) überprüft. Die Überprüfung bestätigte die Resultate. Sofern also eine Druckabhängigkeit des Mizellenzustands und/ oder ein Lösungsdichtegradient vorlag, führte dies zu keiner Fehlinterpretation der bei 40 000 Upm aufgenommenen Daten.

Um eine etwaige Abhängigkeit der Kompensationsdichte von der C₁₂E₉-Konzentration zu erfassen, wurden zusätzlich zu den Experimenten mit 0,3% (w/v) C₁₂E₉ analoge Experimente mit 0,1% (w/v) bzw. 0,5% (w/v) C₁₂E₉ durchgeführt. Zu jeder Konzentration wurde eine Saccharose-Reihe, eine Glycerin-Reihe und eine D₂O-Reihe angesetzt. Um den Aufwand zu reduzieren, wurden pro Reihe nur 3 Proben mit Lösungsdichten im Bereich der mit 0,3% C₁₂E₉ ermittelten Kompensationsdichten hergestellt. Als Rotordrehzahl wurde 40 000 Upm gewählt. Das Ergebnis lautete für die 3 betrachteten Densifier gleichermaßen: Die für einen Densifier charakteristische Kompensationsdichte von C₁₂E₉ war unabhängig von der C₁₂E₉-Konzentration im genannten Konzentrationsbereich. Dieser war so gewählt, daß sein Minimum weit über der kritischen Mizellenkonzentration lag ($\text{CMC}(\text{C}_{12}\text{E}_9)$: s. *Tabelle 4-1*). Dadurch war die Konzentration der Mizellen ausreichend für deren Detektion in der analytischen Ultrazentrifuge. Außerdem ist der Bereich zwischen 0,1% und 0,5% C₁₂E₉

typisch für die Aufreinigung, Aufbewahrung und Analyse von solubilisierten integralen Membranproteinen.

Die Temperaturabhängigkeit des zur Dichtekompensation nötigen Densifier-Gehalts wurde anhand der in *Abbildung 5.1* dargestellten Glyzerinreihe näher untersucht. Dazu wurden die Messungen bei Temperaturen zwischen 8°C und 18°C wiederholt. Die dichtekompensierende Glyzerinkonzentration ist in (*Abbildung 5.2A*) in Abhängigkeit von der Temperatur T aufgetragen. Man sieht, daß eine Temperatursenkung zusätzliches Glyzerin erfordert, um die $C_{12}E_9$ -Mizellen „in der Schwebe“ zu halten (pro 1 K Temperatursenkung zusätzlich $(0,126 \pm 0,009)\%$ (w/v) Glyzerin). Die beiden Gleichgewichtsprofile in *Abbildung 5.2B* verdeutlichen diese Tendenz: Während die $C_{12}E_9$ -Mizellen in Gegenwart von 12% (w/v) Glyzerin bei 12°C sedimentieren, schwimmen sie bei 18°C auf. Da die Lösungsdichte ρ im untersuchten Temperaturbereich mit steigender Temperatur sinkt ($\partial\rho/\partial T = -\rho\alpha < 0$; α : kubischer (isobarer) Wärmeausdehnungskoeffizient), folgt zum einen aus der beobachteten Temperaturabhängigkeit von $C_{12}E_9$ in wässriger Lösung, daß für die Mizellen ebenfalls $\partial\rho/\partial T < 0$ gilt, zum anderen, daß $|\partial\rho/\partial T|$ für die Mizellen größer ist als für die Lösung.

Für den Einsatz der beschriebenen Varianten, die $C_{12}E_9$ -Dichte zu kompensieren, in Sedimentationsgleichgewichtsexperimenten zur Untersuchung integraler Membranproteine ist die Viskosität der Kompensationspuffer von Belang: Davon hängt die Einstellungsdauer des Sedimentationsgleichgewichts ab, eine mitunter entscheidende Größe bei mäßig stabilen Proteinen. Darüber hinaus ist die Kenntnis der Viskosität für die Auswertung von s -Läufen nötig. Deshalb seien die dynamischen Viskositäten zu den in diesem Kapitel bei 4°C ermittelten Kompensationsbedingungen aufgelistet (0,3% Detergens): Saccharosepuffer: 1,93 cPoise; Glyzerinpuffer: 2,29 cPoise; D_2O -Puffer: 1,81 cPoise.

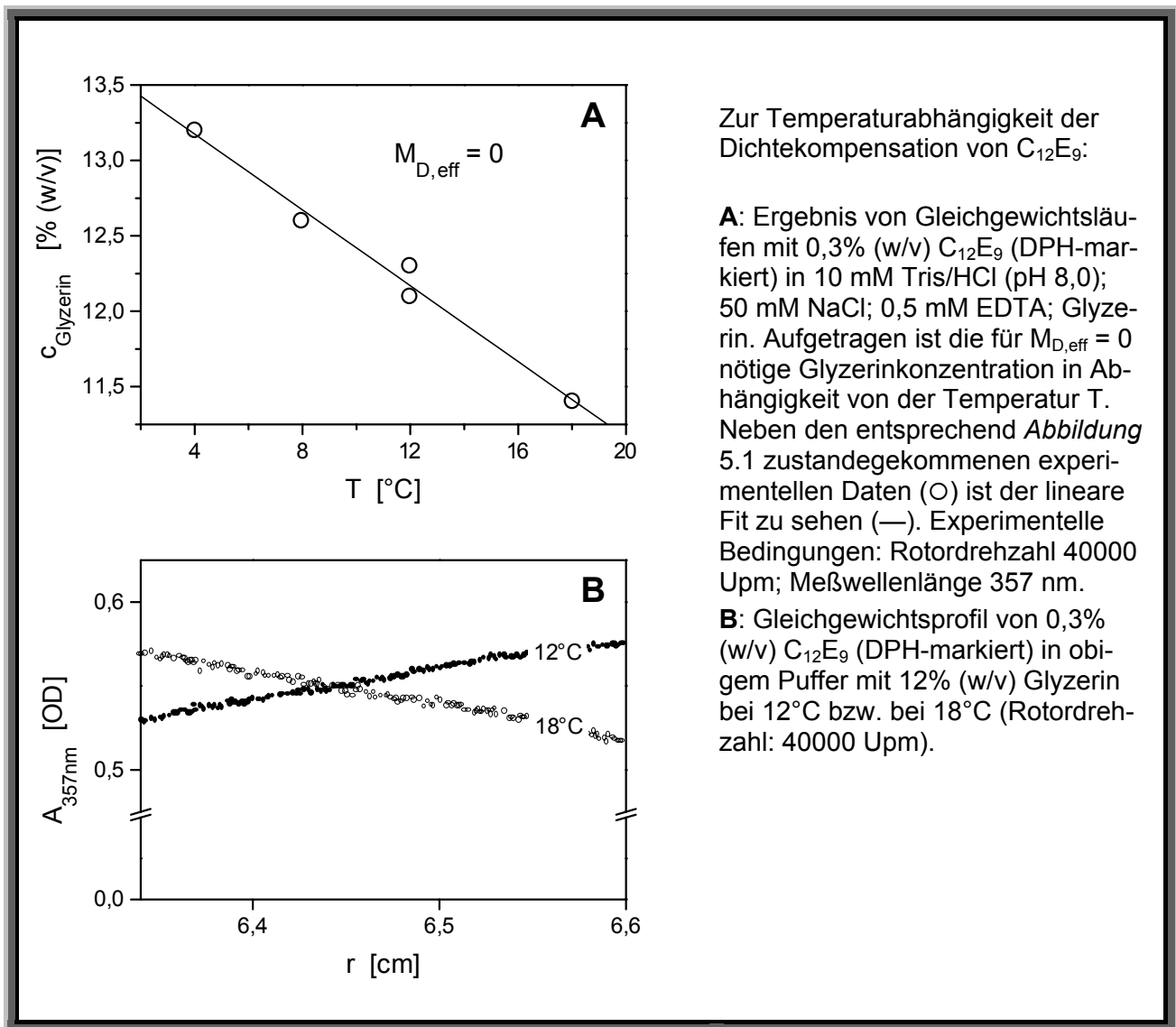


Abbildung 5.2

5.2.2 Dichtekompensation von rTX-100

Zur Kompensation der Schwimmdichte von rTX-100-Mizellen wurde wie im Falle von $C_{12}E_9$ Saccharose bzw. Glycerin eingesetzt. Zur Ermittlung der „passenden“ Saccharose- bzw. Glyzerinkonzentration wurden wie oben 2 Reihen von Pufferlösungen hergestellt, mit folgender Zusammensetzung:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

50 mM NaCl

0,5 mM EDTA

0,33% (w/v) rTX-100

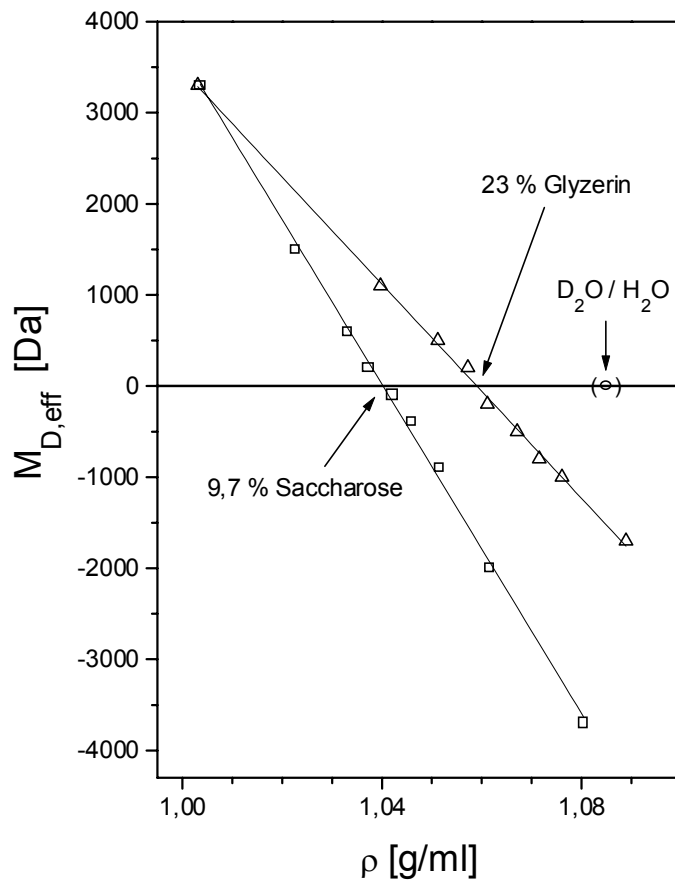
X% (w/v) Saccharose (Reihe 1) **oder Y%** (w/v) Glycerin (Reihe 2)

mit $0 \leq X \leq 20$ und $0 \leq Y \leq 35$

Die Resultate der Ultrazentrifugenuntersuchung dieser Lösungen bei 4°C sind als $M_{D,eff}(\rho)$ in *Abbildung 5.3* dargestellt. Zur Dichtekompensation waren entweder **9,7% (w/v) Saccharose** oder **23,0% (w/v) Glycerin** erforderlich. *Abbildung 5.3* zeigt darüber hinaus – in Klammern – die Kompensationsdichte, die unter Verwendung von D₂O für rTX-100 ermittelt wurde. Dieser Wert wurde der Arbeit von Tziatzios et al. entnommen [150]; er kam unter vergleichbaren, aber nicht identischen Bedingungen zustande (Temperatur: 6°C). Die für rTX-100 ermittelten Kompensationsdichten – **1,043 g/ml** mit Saccharose; **1,054 g/ml** mit Glycerin; ca. **1,085 g/ml** mit D₂O als Densifier – unterscheiden sich voneinander noch deutlicher als diejenigen für C₁₂E₉. Dies läßt sich mit der höheren Dichte von rTX-100 erklären, deren Kompensation eine höhere Saccharose- bzw. Glycerinkonzentration erfordert, was den beschriebenen Effekt verstärkt.

Die in *Abbildung 5.3* dargestellten Ergebnisse zu den beiden Densifier-Reihen beruhen auf Zentrifugationen bei 40 000 Upm. Die bei dieser Rotordrehzahl auftretende Druckdifferenz zwischen Probenmeniskus und Probenboden¹¹ könnte zur Folge haben, daß die Detergensmizellen ihre Eigenschaften – etwa ihre Dichte – abhängig von der radialen Position r signifikant ändern. Die Auswirkung einer Zunahme der Mizellendichte mit steigendem Druck bzw. r (bei konstanter Pufferdichte) ist in *Abbildung 5.4A* skizziert, ebenso in *Abbildung 5.4B*, welche den prinzipiellen Verlauf eines (zeitlich konstanten) $A(r)$ -Profils druckabhängiger Mizellen im Bereich der Kompensationsbedingung andeutet. Sei nun umgekehrt die Mizellendichte unabhängig vom Druck, während die Pufferdichte mit zunehmendem Radius steige, siehe *Abbildung 5.4C*, so verläuft das Gleichgewichtsprofil der Mizellen wie in *Abbildung 5.4D* angedeutet.

¹¹ Am Boden einer voll gefüllten äußeren Kammer eines Standard-6-Kanal-Mittelstücks herrscht bei einer Lösungsdichte von 1,054 g/ml und bei einer Rotordrehzahl von 40 000 Upm ein Druck von ca. $47 \cdot 10^5$ Pa.



Ergebnis des Gleichgewichtslaufs mit 0,33% (w/v) rTX-100 in Pufferlösungen unterschiedlicher Saccharose- bzw. Glyzerinkonzentration. Aufgetragen ist die effektive Molmasse der rTX-100-Mizellen gegen die Lösungsdichte; die Dichtekompensation ergibt sich aus $M_{D,eff} = 0$.

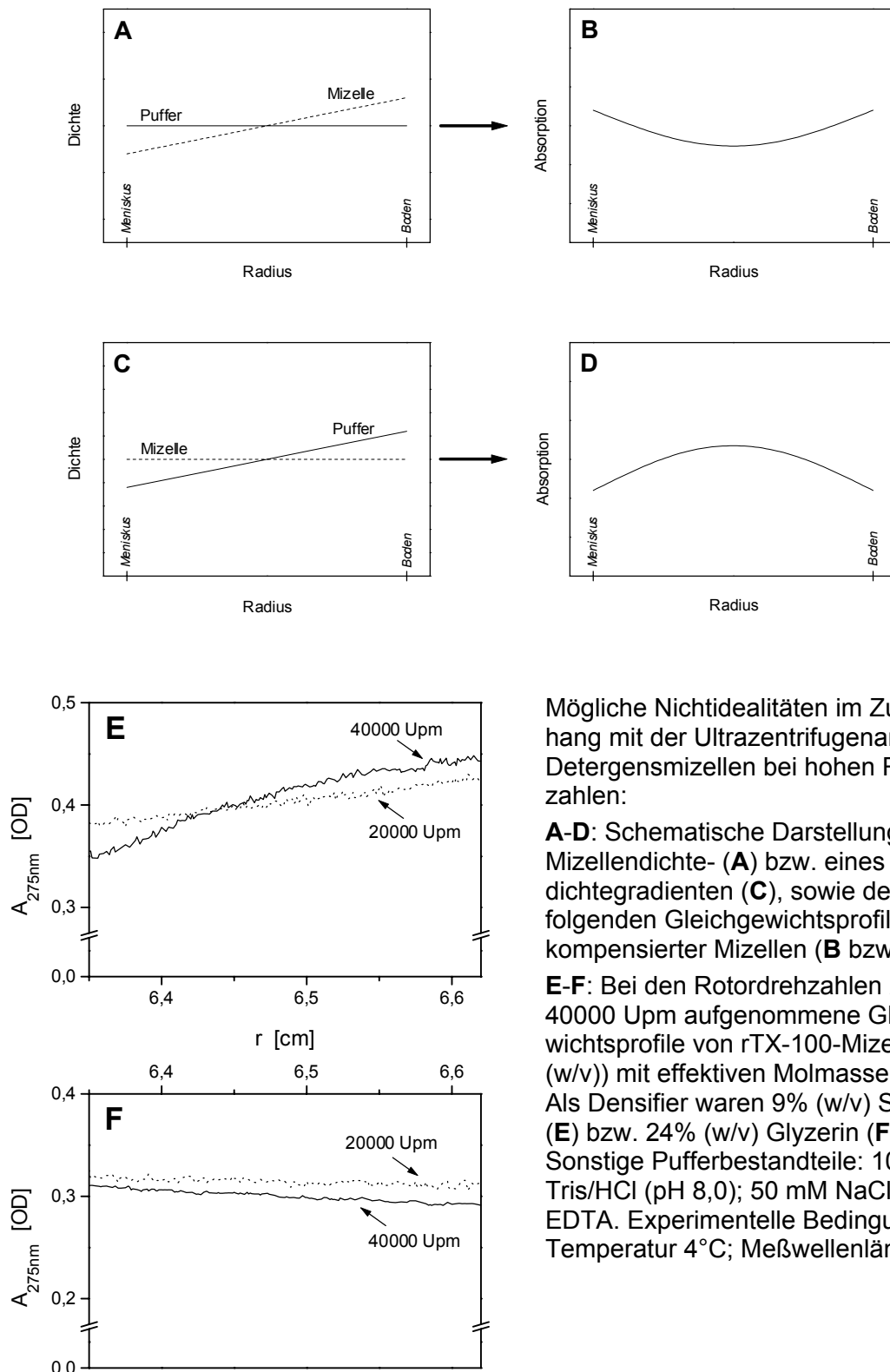
Experimentelle Bedingungen: Rotordrehzahl 40000 Upm; Rotortemperatur 4°C; Meßwellenlänge 275 nm. Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0-20% (w/v) Saccharose (\square) oder 0-35% (w/v) Glyzerin (Δ).

$M_{D,eff} = 0$ wurde erfüllt durch 9,7% Saccharose ($\rho = 1,043$ g/ml) bzw. 23% Glyzerin ($\rho = 1,054$ g/ml).

Die Anpassungen (durchgezogene Linien) dienen der Orientierung.

Der Wert für die mittels D_2O (bei 6°C) gemessene Kompensationsdichte, $\rho = 1,085$ g/ml (\circ), stammt aus [150].

Abbildung 5.3



Mögliche Nichtidealitäten im Zusammenhang mit der Ultrazentrifugalanalyse von Detergensmizellen bei hohen Rotordrehzahlen:

A-D: Schematische Darstellung eines Mizellendichte- (**A**) bzw. eines Pufferdichtegradienten (**C**), sowie der daraus folgenden Gleichgewichtsprofile dichte-kompensierter Mizellen (**B** bzw. **D**).

E-F: Bei den Rotordrehzahlen 20000 und 40000 Upm aufgenommene Gleichgewichtsprofile von rTX-100-Mizellen (0,33% (w/v)) mit effektiven Molmassen nahe „0“. Als Densifier waren 9% (w/v) Saccharose (**E**) bzw. 24% (w/v) Glycerin (**F**) zugegeben. Sonstige Pufferbestandteile: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA. Experimentelle Bedingungen: Temperatur 4°C; Meßwellenlänge 275nm.

Abbildung 5.4

Tritt ein Pufferdichtegradient auf, kann dies nicht von einer Druckabhängigkeit der Lösungsmitteldichte herrühren, da wäßrige Lösungen praktisch inkompressibel sind. Es kann aber Folge der Sedimentation von bestimmten Lösungsbestandteilen, z.B. Saccharose, sein. Daß dieser Fall nicht nur theoretische Bedeutung hat, zeigt *Tabelle 5-1* ebenso wie *Abbildung 5.4E*: Dem linken Teil der Tabelle, die eine Einschätzung von der Größenordnung der Konzentrationsgradienten von Saccharose bzw. Glycerin bei verschiedenen Rotordrehzahlen vermitteln soll, läßt sich entnehmen, daß sich die Saccharosekonzentration in der Probenlösung bei hohen Drehzahlen radial merklich ändert – im vorliegenden Beispiel (40 000 Upm) um ca. $\pm 15\%$ (bezogen auf die mittlere Saccharosekonzentration)¹² –, während bei gemäßigten Drehzahlen, die bei Sedimentationsgleichgewichtsanalysen von Proteinen üblich sind, die Konzentrationsänderung wenige Prozent beträgt, somit im Rahmen der Genauigkeit der Meßmethode zu vernachlässigen ist. Die experimentelle Bestätigung dieser Berechnung ist in *Abbildung 5.4E* zu sehen, welche Sedimentationsgleichgewichtsprofile nahezu-kompensierter rTX-100-Mizellen darstellt: Das bei einer Rotordrehzahl von 40 000 Upm erhaltene Profil zeigt eine deutlich nichtideale Charakteristik, die derjenigen in *Abbildung 5.4D* entspricht, während das Profil bei 20 000 Upm offensichtlich durch eine Boltzmannfunktion zu beschreiben ist.¹³

Während Saccharose bei hohen Drehzahlen einen Dichtegradienten entlang der Flüssigkeitssäule bildet, ist dies bei Glycerin praktisch nicht der Fall, wie die entsprechenden Werte in *Tabelle 5-1* andeuten. Dies wird durch das Experiment bekräftigt: Weder bei 20 000 noch bei 40 000 Upm zeigt sich anomales Verhalten, siehe *Abbildung 5.4F*.

¹² Der Saccharosegradient ist theoretisch exponentiell, in guter Näherung jedoch linear.

¹³ Vorausgesetzt, die „Nichtidealitäten“ beruhen ausschließlich auf einem Gradienten der Pufferdichte $\rho(r)$, läßt sich dieser im Prinzip aus dem Gleichgewichtsprofil der Detergensmizellen bestimmen (am genauesten, wenn deren Auftriebsdichte inmitten des Dichtegradienten liegt): Dazu muß zu verschiedenen Radialpositionen r die lokale effektive Molmasse der Mizellen, $M_{D,eff}(r) = M_D(1 - \bar{v}_D \rho(r))$, ermittelt werden; mit Kenntnis der Molmasse und des partialspezifischen Volumens der Mizelle, M_D bzw. \bar{v}_D , ergibt sich $\rho(r)$ aus $M_{D,eff}(r)$.

Tabelle 5-1

Saccharose		Glyzerin
$C_{\text{Boden}} / C_{\text{Meniskus}}$	Rotordrehzahl	$C_{\text{Boden}} / C_{\text{Meniskus}}$
1,36	40 000 Upm	1,04
1,08	20 000 Upm	1,01
1,04	15 000 Upm	1,01
1,03	12 000 Upm	1,00

Zur Dichtegradientenbildung aufgrund der Zentrifugation einer saccharose- bzw. glyzerinhaltigen Lösung bei hohen Rotordrehzahlen:

Verhältnis der Saccharose- bzw. Glycerinkonzentration am Probenboden (C_{Boden} ; Bodenposition: $r_{\text{Boden}} = 7,20 \text{ cm}$) zu derjenigen am Probenmeniskus (C_{Meniskus} ; Meniskusposition: $r_{\text{Meniskus}} = 6,75 \text{ cm}$) in Abhängigkeit von der Rotordrehzahl. Die Abschätzung basiert auf der Annahme einer Sedimentationsgleichgewichtsverteilung der ideal¹⁴ sedimentierenden Komponente Saccharose bzw. Glycerin. Zur Berechnung herangezogen wurden die Lösungsdichten, die den Kompensationsdichten für rTX-100 entsprechen: 1,043 g/ml (Saccharose) bzw. 1,054 g/ml (Glycerin), sowie die bekannten Werte für Molmasse und Dichte eines Saccharose- bzw. Glycerinmoleküls. Als Temperatur wurde 4°C angenommen.

Um sicherzugehen, daß aus den in *Abbildung 5.3* dargestellten, bei 40 000 Upm gewonnenen Datenpunkten der Saccharose- und Glycerinreihe die korrekten Kompensationsdichten bzw. -konzentrationen folgen, wurde das Experiment mit den beiden Reihen bei niedrigeren Drehzahlen wiederholt: Reihe 1 bei 20 000 und 15 000 Upm, Reihe 2 bei 20 000 und 13 000 Upm. Die bei 40 000 Upm gewonnenen Ergebnisse wurden bestätigt und damit auch das mit einer Komponente operierende Auswerteverfahren, das im Falle der besprochenen Nichtidealitäten ein gemittelttes $M_{D,\text{eff}}$ liefert.

Um eine etwaige Abhängigkeit der Kompensationsdichte von der rTX-100-Konzentration zu erfassen, wurden zusätzlich zu den Experimenten mit 0,33% (w/v) rTX-100 analoge Experimente mit 0,1% (w/v) bzw. 0,5% (w/v) rTX-100 durchgeführt. Zu jeder Konzentration wurde eine Saccharose-Reihe und eine Glycerin-Reihe angesetzt. Es wurden pro Reihe 3 Proben mit Pufferdichten im Bereich der mit 0,33% rTX-100 ermittelten Kompensationsdichten herge-

¹⁴ Nichtidealitäten verringern i.A. den Konzentrationsgradienten.

stellt; Rotordrehzahl war 40 000 Upm. Das Ergebnis entsprach demjenigen für C₁₂E₉: Sowohl mit Saccharose als auch mit Glycerin als Densifier war die Kompensationsdichte von rTX-100 unabhängig von der rTX-100-Konzentration im genannten Konzentrationsbereich (in dem üblicherweise die Arbeit mit solubilisierten Membranproteinen stattfindet). Dieser Bereich wurde so gewählt, daß die niedrigste Konzentration noch weit über der kritischen Mizellenkonzentration lag (CMC(rTX-100): s. *Tabelle 4-1*), wodurch die Konzentration der Mizellen in allen Fällen ausreichend für deren Detektion in der analytischen Ultrazentrifuge war.

Zur Abschätzung der Temperaturabhängigkeit des zur Kompensation der rTX-100-Dichte nötigen Densifiergehalts wurde das in *Abbildung 5.3* dargestellte, mit der Saccharose- sowie der Glycerinreihe durchgeführte Experiment bei 12°C wiederholt, mit dem Ergebnis, daß zur Dichtekompensation von rTX-100 pro 1 K Temperatursenkung zusätzlich ca. 0,04% (w/v) Saccharose bzw. 0,13% (w/v) Glycerin nötig sind¹⁵. Somit verhalten sich diesbezüglich rTX-100-Mizellen im Prinzip ebenso wie C₁₂E₉-Mizellen (s.o.).

Abschließend seien die dynamischen Viskositäten zu den in diesem Kapitel bei 4°C ermittelten Kompensationsbedingungen aufgeführt (0,33% Detergens): Saccharosepuffer: 2,17 cPoise; Glycerinpuffer: 3,02 cPoise.

5.2.3 Dichtekompensation von DDM

Die Kompensation der Schwimmdichte von DDM-Mizellen durch Saccharose bzw. Glycerin erfordert aufgrund der hohen DDM-Dichte einen beträchtlichen Densifiergehalt: ca. 39% (w/v) Saccharose (s. Diskussion) oder ca. 96% (w/v) Glycerin¹⁶ bei 4°C in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA [81]. Mit Blick auf den Zweck von Dichtekompensation, die Vereinfachung der Ultrazentrifugenuntersuchung von Membranproteinen, wurde der Einsatz von Glycerin nicht weiterverfolgt. Auch die Kompensationskonzentration von Saccharose, dem effektivsten der in dieser Arbeit verwendeten Densifier¹⁷, liegt in einer Größenordnung, die hinsichtlich der Untersuchung von Membranproteinen problematisch ist:

¹⁵ Bei der Interpretation dieser Werte ist zu beachten, daß sich der kubische Wärmeausdehnungskoeffizient der Saccharoselösung von demjenigen der Glycerinlösung unterscheiden dürfte.

¹⁶ 96% (w/v) Glycerin entsprechen ca. 76% (v/v) Glycerin. Zu beachten: Bei einer Konzentrationsangabe in % w/v = g / 100 ml sind Konzentrationen > 100% möglich; so ist Saccharose in Wasser bei 25°C bis zu einer Konzentration von 200% (w/v) löslich.

¹⁷ Dichten der Reinsubstanzen: Saccharose: 1,59 g/ml; Glycerin: 1,26 g/ml; D₂O: 1,11 g/ml.

Saccharose erhöht – wie Glycerin – die Viskosität der Lösung erheblich und beeinflusst das partialspezifische Volumen des Untersuchungsobjekts. Da jedoch DDM Membranproteine sehr schonend solubilisiert bzw. in Lösung hält und in der Biochemie dementsprechend durchgesetzt ist, und da mit dem bc_1 -Komplex von *Paracoccus denitrificans* ein Protein zu untersuchen war, das nur in DDM-Lösung ausreichend stabil ist (s. u.), wurde ein Verfahren zur Dichtekompensation von DDM ausgearbeitet mit dem Ziel, die genannten Probleme zu entschärfen. Dies sollte erreicht werden durch den kombinierten Einsatz von Saccharose und D_2O , wobei ein möglichst hoher D_2O -Gehalt (95% Volumenanteil, bezogen auf den Wasseranteil der Lösung) die Kompensationskonzentration von Saccharose minimieren sollte.

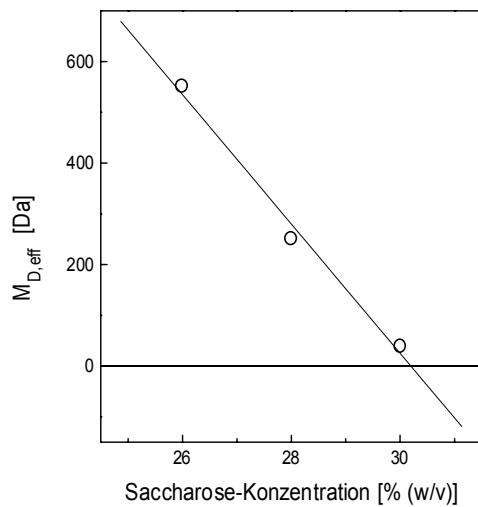
Zur Ermittlung der passenden Saccharosekonzentration wurden Pufferlösungen mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
50 mM NaCl
0,5 mM EDTA
0,2% (w/v) DDM (DPH-markiert)
X% (w/v) Saccharose
95/5 (v/v) D_2O/H_2O

mit $26 \leq X \leq 30$ (zur Herstellung der Lösungen s. *Anhang 2*).

Die Ergebnisse der Ultrazentrifugenuntersuchung dieser Lösungen bei 4°C sind als $M_{D,eff}$, aufgetragen gegen die Saccharosekonzentration, in *Abbildung 5.5* dargestellt. Es zeigt sich, daß zur Herstellung der Bedingung $M_{D,eff} = 0$ in Gegenwart von 95% D_2O **30,2% (w/v) Saccharose** notwendig sind. Daraus folgt eine Kompensationsdichte von **1,201 g/ml**. Zum Vergleich: Nach [118] beträgt die Dichte der DDM-Mizelle (Detergens ohne Hydrathülle) ca. 1,23 g/ml (Densifier: $D_2^{18}O/D_2O$; Extrapolation nötig); kompensiert man andererseits die DDM-Dichte ausschließlich mit Saccharose, liegt die Kompensationsdichte nach [77] im Bereich von 1,12 g/ml (s. Diskussion).

Den Daten läßt sich entnehmen, daß durch den Einsatz von D_2O einerseits die Kompensations-**Konzentration** von Saccharose um ca. 9% (w/v) **gesenkt** wird. Andererseits wird die Kompensations-**Dichte** deutlich **erhöht**; vermutlich wird generell durch den (teilweisen) Ersatz von Saccharose durch D_2O die Wirkung der Dichtekompensation auf \bar{v} reduziert. Von daher ist es ratsam, die Kompensation der DDM-Dichte mit Saccharose nur in Kombination mit D_2O (wenn verfügbar mit $D_2^{18}O$) durchzuführen.



Ergebnis des Gleichgewichtslaufs mit 0,2% (w/v) DDM (DPH-markiert) in Pufferlösungen unterschiedlicher Saccharosekonzentration. Die Daten (○) wurden linear angepaßt (—). $M_{D,eff}$, die effektive Molmasse der DDM-Mizellen, verschwindet bei einer Saccharosekonzentration von 30,2% (w/v).

Experimentelle Bedingungen: Rotordrehzahl 40000 Upm; Rotortemperatur 4°C; Meßwellenlänge 357 nm (Absorptionsmaximum von DPH). Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 26-30% (w/v) Saccharose; 95/5 (v/v) D₂O/H₂O.

Abbildung 5.5

Da das bisher zugrundegelegte Puffersystem für die Untersuchung des bc_1 -Komplexes in DDM-Lösung ungeeignet ist, wurde in einem weiteren Experiment mit einer entsprechend veränderten Pufferzusammensetzung die Kompensationsbedingung für DDM in Gegenwart von 95% D₂O gesucht. Hierfür wurden Pufferlösungen mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

50 mM MES/NaOH (pH 6,0)
 300 mM NaCl
 0,2% (w/v) DDM (DPH-markiert)
 X% (w/v) Saccharose
 95/5 (v/v) D₂O/H₂O

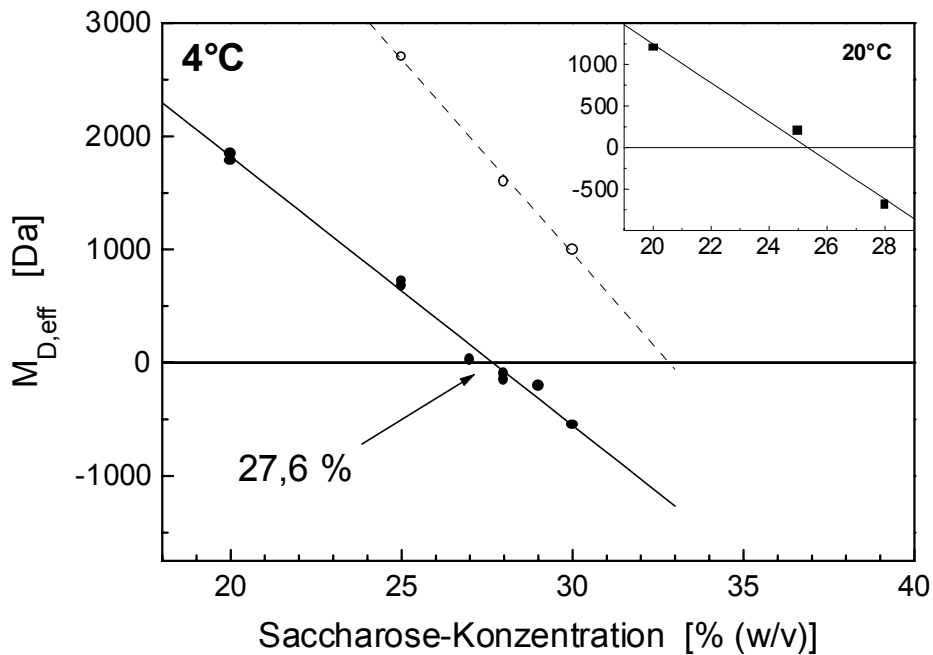
mit $20 \leq X \leq 30$.

Abbildung 5.6 zeigt die Meßergebnisse: Aufgetragen ist die effektive Molmasse der DDM-Mizelle gegen die Saccharosekonzentration (Temperatur der Lösungen: 4°C). Die Interpolation der Daten auf $M_{D,eff} = 0$ zeigt, daß das Detergens bei **27,6% (w/v) Saccharose**, entsprechend einer Dichte von **(1,207 ± 0,002) g/ml**, schwebt.

Zwei Variationen des Experiments sind ebenfalls in *Abbildung 5.6* dargestellt: Zum einen wurde die Kompensationsbedingung bei 20°C statt bei 4°C gesucht, wobei sich zeigte, daß zur Dichtekompensation von DDM pro K Temperatursenkung ca. 0,14% (w/v) Saccharose zusätzlich nötig sind (dies reiht sich der Tendenz nach in die entsprechenden Befunde zu C₁₂E₉ und rTX-100 ein). Zum anderen wurde die Kompensationsbedingung bei 50% statt bei 95% (v/v) D₂O (bei 4°C) ermittelt. Die 5-6% (w/v) Saccharose, die durch Senkung des D₂O-Gehaltes offenbar zusätzlich nötig sind, geben eine Einschätzung von der Größenordnung des Effekts, dessentwegen D₂O eingesetzt wurde: zum Minimieren der für die Kompensation nötigen Saccharosekonzentration.

Die zur Dichtekompensation von DDM nötige Saccharosekonzentration ist im MES-gepufferten System aufgrund seines hohen Salzgehalts niedriger als im Tris-gepufferten. Die Kompensationsdichte ist im MES-Puffer dagegen etwas höher, was darauf hinweist, daß NaCl mehr in die unmittelbare Umgebung der DDM-Mizelle integriert ist als Saccharose.

Die in *Abbildung 5.5* und *Abbildung 5.6* dargestellten Daten beruhen auf Zentrifugationen, die mit einer Drehzahl von 40 000 Upm durchgeführt wurden. Die Rohdaten zu den Abbildungen zeigten Nichtidealitäten, die auf die Bildung eines Saccharosegradienten schließen lassen (s.o.). Deshalb wurde zur Kontrolle das Experiment bei 20 000 Upm wiederholt. Bei dieser Drehzahl waren keine Nichtidealitäten zu erkennen, die bei 40 000 Upm ermittelten Kompensationskonzentrationen von Saccharose wurden bestätigt.



Resultat des Gleichgewichtslaufs mit 0,2% DPH-markiertem DDM in Pufferlösungen unterschiedlicher Saccharosekonzentration; die Dichtekompensation ergibt sich aus der Bedingung $M_{D,eff} = 0$. Experimentelle Bedingungen: Rotorgeschwindigkeit 40000 Upm; Rortemperatur 4°C (bzw. 20°C); Meßwellenlänge 357 nm (Absorptionsmaximum von DPH). Puffer: 50 mM MES/NaOH (pH 6,0); 300 mM NaCl; 20-30% (w/v) Saccharose; 95/5 (v/v) D₂O/H₂O.

Große Graphik: Unter den für die weiteren Untersuchungen vorgesehenen Bedingungen (95% (v/v) D₂O; 4°C) aufgenommene Daten (●) und linearer Fit (—); $M_{D,eff} = 0$ bei 27,6% Saccharose. Daten (○) und linearer Fit (---) auf Basis von 50% (v/v) D₂O (4°C); $M_{D,eff} = 0$ bei ca. 33% Saccharose. Kleine Graphik (Achsenbeschriftung s. große Graphik): Bei 20°C (95% (v/v) D₂O) gemessene Daten (■), linearer Fit (—); $M_{D,eff} = 0$ bei 25-26% Saccharose.

Abbildung 5.6

5.2.4 Dichtekompensation durch Kombination von LDAO und C₁₂E₉

Die hier beschriebene Art der Dichtekompensation greift im Unterschied zur bisherigen Praxis nicht in die Zusammensetzung der Lösung ein, sondern in diejenige des Detergens. Im vorliegenden Fall sollten LDAO und C₁₂E₉ so gemischt werden, daß die Dichte der resultierenden Mischmizellen und die Lösungsdichte gleich sind. Um das entsprechende Mischungsverhältnis zu ermitteln, wurden folgende Lösungen einer Sedimentationsgleichgewichtsanalyse unterzogen (Rotortemperatur 4°C):

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

50 mM NaCl

0,5 mM EDTA

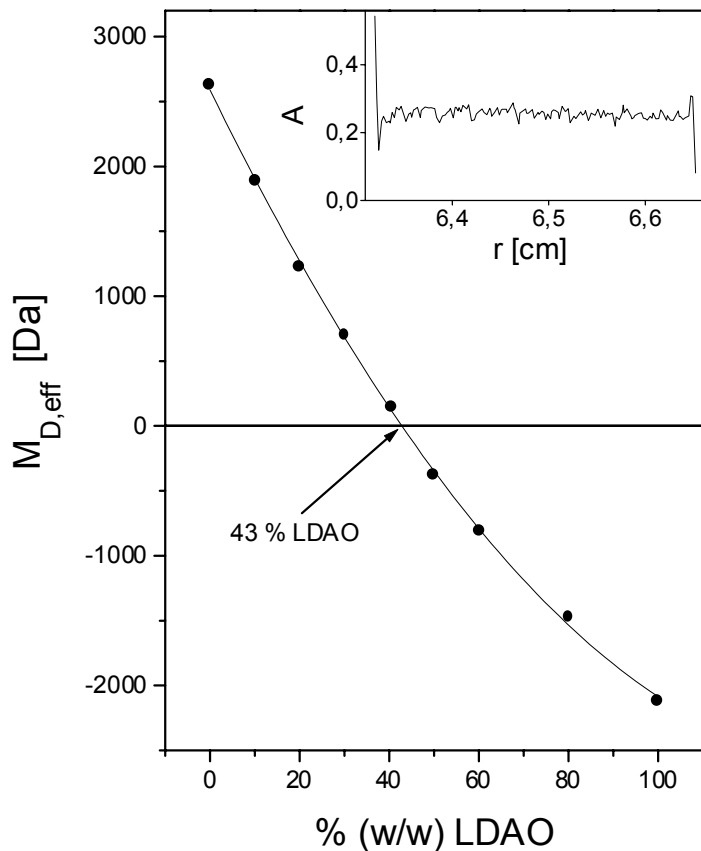
0,2% (w/v) Detergens (LDAO+C₁₂E₉, DPH-markiert) mit **Z%** (w/w) LDAO

mit $0 \leq Z \leq 100$, wobei **Z%** (w/w) LDAO = $m(\text{LDAO})/m(\text{LDAO}+\text{C}_{12}\text{E}_9)$ das LDAO-C₁₂E₉-Mischungsverhältnis definiert.

Die effektive Molmasse der Detergensmizellen, $M_{D,\text{eff}}$, als Funktion des Mischungsverhältnisses liefert nach Interpolation auf $M_{D,\text{eff}} = 0$ die gewünschte Detergenszusammensetzung (s. *Abbildung 5.7*): Eine Mizelle mit **LDAO/C₁₂E₉ = 43/57 (w/w)** kompensiert die Lösungsdichte, die bei 4°C **1,003 g/ml** beträgt.

Der Einschub in *Abbildung 5.7*, der ein typisches Gleichgewichtsprofil von LDAO-C₁₂E₉-Mizellen unter der Bedingung der Dichtekompensation darstellt, beweist, daß die wie beschrieben hergestellte Detergensemischung in wässriger Lösung (praktisch) einheitliche Mischmizellen bildet. Andernfalls wäre das Profil zwischen Meniskus und Boden keine horizontale Gerade, sondern zeigte aufschwimmende und sedimentierende Bestandteile, entsprechend Mizellen mit überdurchschnittlichem und mit unterdurchschnittlichem LDAO-Gehalt (ähnlich *Abbildung 5.4B*).

Der Vergleich des bei hoher Rotordrehzahl gemessenen A(r)-Profils aus *Abbildung 5.7* (Einschub) mit dem A(r)-Profil in *Abbildung 5.4B* läßt darüberhinaus erkennen, daß eine Druckabhängigkeit der Mischmizellen-Dichte keine Rolle spielt. Mangels entsprechender Densifizierung kann ein Lösungsdichtegradient ohnehin ausgeschlossen werden.



Ergebnis des Gleichgewichtslaufs mit 0,2% (w/v) Detergens (LDAO + C₁₂E₉, DPH-markiert) in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA. Aufgetragen ist die effektive Molmasse der Mischmizellen gegen das LDAO-C₁₂E₉-Mischungsverhältnis, sie verschwindet bei LDAO/C₁₂E₉ = 43/57 (w/w). Die experimentellen Daten (●) wurden zur Orientierung mittels polynomischer Regression angepaßt (—).¹⁸

Einschub: A(r)-Gleichgewichtsprofil DPH-markierter Mischmizellen unter der Bedingung der Dichtekompensation.

Experimentelle Bedingungen: Rotordrehzahl 40000 Upm; Rortemperatur 4°C; Meßwellenlänge 357 nm (Absorptionsmaximum von DPH).

Abbildung 5.7

Das in der Hauptgraphik von *Abbildung 5.7* dargestellte Experiment wurde bei einer Detergens-Gesamtkonzentration von 0,2% (w/v) durchgeführt. Im Einschub derselben Abbildung

¹⁸ Vorausgesetzt, LDAO und C₁₂E₉ mischen sich ideal und bilden damit einheitliche Mizellen; weiterhin vorausgesetzt, die Konzentrationen der Detergenzien liegen weit über dem jeweiligen CMC: dann läßt sich durch entsprechende Transformation der Abszisse die $M_{D,eff}$ -versus-Mischungsverhältnis-Auftragung theoretisch linearisieren. Durch Anwendung dieser Transformation auf die hier dargestellten Datenpunkte konnten diese sehr gut linear angepaßt werden. Die im Prinzip einfache, jedoch etwas aufwendige Transformation soll hier ebensowenig gezeigt werden, wie der lineare Fit, da es lediglich darauf ankommt, zu bestätigen, was der Einschub dieser Abbildung auf einfache Weise beweist: daß LDAO und C₁₂E₉ einheitliche Mizellen bilden, zumindest wenn sie wie oben beschrieben gemischt werden.

sieht man dichtekompensierende Mischmizellen auf Grundlage einer Detergens-Gesamtkonzentration von 0,3% (w/v) mit 40% (w/w) LDAO, unter sonst identischen Verhältnissen. Außerdem wurde die Kompensationsbedingung für 0,1% (w/v) und 0,5% (w/v) Detergens-Gesamtkonzentration (unter sonst identischen Verhältnissen) gesucht. Die resultierende Konzentrationsreihe ist in *Tabelle 5-2* zusammengetragen, welche das für $M_{D,eff} = 0$ nötige LDAO- $C_{12}E_9$ -Mischungsverhältnis als Funktion der Detergens-Gesamtkonzentration zeigt. Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Kompensationsbedingung abhängig von der Detergenskonzentration ist. Genauer: Bei gegebenem Mischungsverhältnis sinkt die Dichte der gemischten Mizellen mit zunehmender Detergens-Gesamtkonzentration bis zu einer Konzentration von ca. 0,3% (w/v) Detergens. Eine weitere Steigerung der Detergenskonzentration führt zu keiner weiteren Änderung der Mizellendichte.

Tabelle 5-2

Detergens-Gesamtkonzentration [% (w/v)]	Kompensations-Mischungsverhältnis [% (w/w) LDAO]
0,1	45
0,2	43
0,3	40
0,5	40

Die in *Tabelle 5-2* dargestellte Abhängigkeit der Mizellendichte von der Detergenskonzentration läßt sich auf Basis der deutlich unterschiedlichen kritischen Mizellenkonzentrationen der beteiligten Detergenzien (s. *Tabelle 4-1*) aus dem Raoult'schen Gesetz erklären (s. Kap. 4.1.1, „Detergensmischungen“). Daraus läßt sich umgekehrt schließen, daß nicht nur bei einheitlichen Detergenzien wie DDM oder LDAO eine derartige Abhängigkeit nicht gegeben ist, sondern auch bei einer Detergensmischung, wenn die kritischen Mizellenkonzentrationen der einzelnen Mischungsbestandteile entweder ähnlich sind oder weit unterhalb des betrachteten Konzentrationsbereichs liegen (vgl. die Konzentrationsunabhängigkeit der polydispersen Detergenzien $C_{12}E_9$ = „Thesit“ und rTX-100).

Mit Blick auf Sedimentationsgleichgewichtsuntersuchungen integraler Membranproteine ist die Mischdetergens-Methode insofern hervorzuheben, als mit ihr Dichtekompensation ohne

viskositätssteigernde Mittel erfolgt. Dementsprechend liegt bei 4°C die dynamische Viskosität einer LDAO-C₁₂E₉-Lösung mit 0,3% Detergens lediglich bei 1,59 cPoise.

5.3 Anwendung der Kompensationsmethoden auf das „Testprotein“ Cytochrom c-Oxidase

Es gilt im folgenden zu überprüfen, ob bzw. wie weit die neuen Dichtekompensationsverfahren für Ultrazentrifugenuntersuchungen an integralen Membranproteinen geeignet sind. Die entscheidende Frage ist damit, ob die in den neuen Verfahren gewählten Proteinumgebungen Änderungen des Untersuchungsobjekts bewirken, die zu Änderungen der Meßgrößen führen. Als Vergleich dienen dabei die Verhältnisse unter den etablierten Bedingungen der Dichtekompensation.

Zur Erläuterung: Die Dichtekompensation mittels Zusatz von Saccharose oder Glycerin riskiert den bei Detergensmizellen beobachteten Schwimmdichte-Effekt auch am Protein – in zunehmendem Maße mit der Saccharose- bzw. Glycerinkonzentration –, der sich in einer Erhöhung des partialspezifischen Volumens des Proteins äußern würde. Andererseits könnte die bekannte proteinstabilisierende Wirkung der beiden Densifier in bestimmten Fällen eine Veränderung in unerwünschter Richtung (Aufhebung des nativen Zustands durch Aggregation, Zerfall oder Umfaltung) verhindern. Umgekehrt beruht das „Maßschneiden“ dichtekompensierter Mizellen auf dem Zusatz von LDAO, einem vergleichsweise „aggressiven“ Detergens, dessen Gegenwart die Struktur „empfindlicher“ Proteine ändern/ zerstören kann. Weiter könnte im Falle der gemischten Mizellen infolge einer Selektivität der Protein-Detergens-Wechselwirkung das ans Protein gebundene Detergens etwas anders zusammengesetzt sein, als das in den freien Mizellen organisierte.

Der Test der neuen Kompensationsverfahren fand als Sedimentationsgleichgewichtsanalyse eines als „Testprotein“ geeigneten integralen Membranproteins unter den verschiedenen Kompensationsbedingungen statt. Der Vergleich der Ergebnisse, die auf den neuen Verfahren beruhen, mit dem Resultat der etablierten Vorgehensweise, die D₂O als Densifier nutzt, beantwortet die Frage nach der Äquivalenz der verschiedenen Methoden.

5.3.1 Das Cytochrom *c*-Oxidase-Präparat

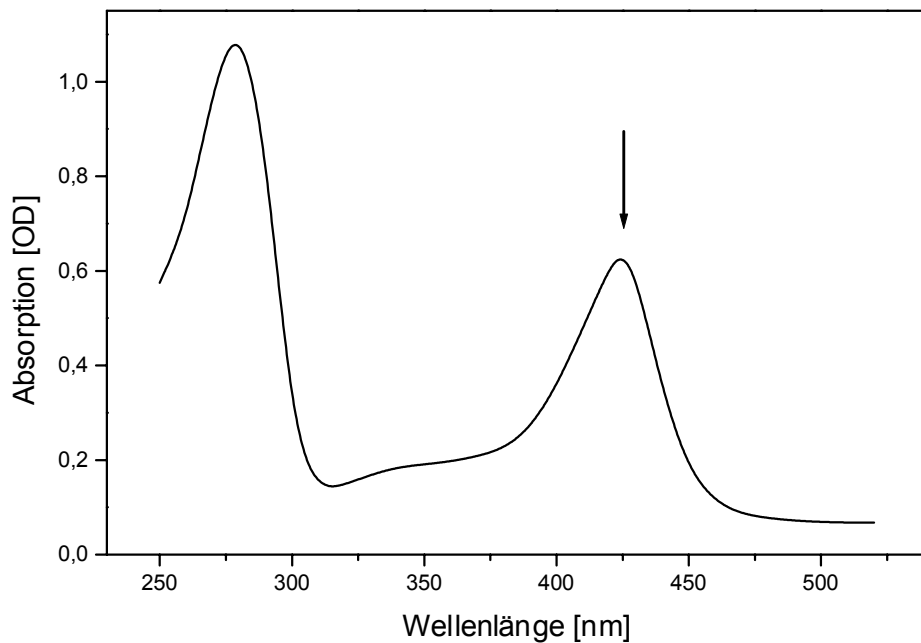
5.3.1.1 Präparation¹⁹

Cytochrom *c*-Oxidase von *Paracoccus denitrificans* (Wildtyp 2.1; Stamm: ATCC13543) wurde wie in [52] beschrieben in Gegenwart von DDM isoliert. Die resultierende Proteinlösung wurde, nach Verdünnung um etwa Faktor 4, einer Ionenaustauscherchromatographie unterzogen, um die Cytochrom *c*-Oxidase aufzureinigen und ggf. in die gewünschte Detergensusumgebung zu überführen: Die proteinbeladene Säule ((8x1) cm; Säulenmaterial: DEAE-Sephacel CL-6B, Pharmacia) wurde bei 4°C mit 3 Säulenvolumina des jeweiligen Puffers gespült, anschließend wurde das Protein mit 40 ml linearem NaCl-Gradient von 50 mM bis 400 mM eluiert. Das Eluat wurde bei 4°C in Ultrafiltrationskammern (Centrisart, Fa. Sartorius, Ausschlußgrenze 100 kDa) ankonzentriert, so daß das Protein um den Faktor 20 bis 40 konzentrierter vorlag als für die Gleichgewichtsanalysen vorgesehen.

Die in Gegenwart von C₁₂E₉, rTX-100 bzw. LDAO/C₁₂E₉ vorliegende Cytochrom *c*-Oxidase wurde verdünnt, wobei gleichzeitig der gewünschte Salzgehalt ausreichend genau eingestellt wurde. Die resultierenden Proteinlösungen beinhalteten die jeweils gewünschte Kompensationsbedingung und konnten unmittelbar in der Ultrazentrifuge untersucht werden.

Die in DDM-Lösung vorliegende Cytochrom *c*-Oxidase wurde bei 4°C via FPLC-Gelfiltrationschromatographie (24 ml Superose 6 HR 10/30, Pharmacia) in 10 mM Tris/HCl (pH 8); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,02% (w/v) DDM („pH 8“) bzw. in 50 mM MES/NaOH (pH 6); 300 mM NaCl; 0,02% (w/v) DDM („pH 6“) überführt. Anschließend wurden die Densifizier zugesetzt: Saccharose über eine Stammlösung, D₂O über Dialyse, die das für die Sedimentationsgleichgewichtsuntersuchung fertige Präparat lieferte. Die genaue Vorgehensweise der Densifizierzugabe, die ähnlich bereits in [113] beschrieben wurde, findet sich in *Anhang 2*.

¹⁹ Durchgeführt von Hans-Werner Müller bzw. Oliver Anderka im Institut für Biophysikalische Chemie und Biochemie, Abt. Molekulare Genetik, JWG-Universität, Frankfurt am Main.



Absorptionsspektrum der Cytochrom c-Oxidase in 10 mM Tris/HCl (pH 8); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,02% (w/v) DDM (aufgenommen bei Raumtemperatur gegen den Puffer). Meßgerät: Hitachi U-2000; Schichtdicke: 1 cm.

Der Pfeil markiert die für die Messungen in der Ultrazentrifuge gewählte Wellenlänge (425 nm).

Abbildung 5.8

5.3.1.2 Eigenschaften des Präparats²⁰

- Die Nativität der Cytochrom c-Oxidase in den verschiedenen Umgebungen wurde vor und nach der jeweiligen Ultrazentrifugenuntersuchung via Bestimmung der enzymatischen Aktivität überprüft [52]. In allen Fällen zeigte sich intaktes Protein (Daten nicht gezeigt).
- Die Reinheit des fertigen Präparats wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt [68] [108]. In keinem Fall waren Verunreinigungen feststellbar (Daten nicht gezeigt).

²⁰ Aktivitätsbestimmung und Gelelektrophorese wurden von Hans-Werner Müller bzw. Oliver Anderka durchgeführt.

- *Abbildung 5.8* zeigt ein typisches Absorptionsspektrum aufgereinigter Cytochrom *c*-Oxidase. Das Absorptionsmaximum bei etwa 425 nm stammt von den in die Cytochrom *c*-Oxidase integrierten Pigmenten. Dieser Wellenlängenbereich ist zweckmäßig für die Ultrazentrifugalanalyse: Da Pigment-freie Proteine/ Proteinfragmente hier nicht absorbieren, würden derartige Verunreinigungen die Untersuchungen nicht stören.
- Die endgültigen Cytochrom *c*-Oxidase-Konzentrationen lagen zwischen 0,1 mg/ml und 0,2 mg/ml, was bei einer Wellenlänge von 425 nm in einer 1 cm-Küvette einer Absorption von maximal ca. 0,33 OD entspricht.
- Um die aus [52] und [59] hervorgehende Homogenität der Cytochrom *c*-Oxidase zu überprüfen und um sicherzugehen, daß sich der Zustand des Proteins im MES/NaCl-System nicht von demjenigen in Tris/NaCl/EDTA unterscheidet, wurde ein Sedimentationsgeschwindigkeitslauf mit 0,17 mg/ml Cytochrom *c*-Oxidase in „pH 6“ und in „pH 8“ durchgeführt (Temperatur: 4°C). Mittels van Holde-Weischet-Analyse wurde das Protein in den verschiedenen Puffern charakterisiert. Es stellte sich heraus, daß beide Bedingungen ein einheitliches Protein gewährleisteten (s. *Abbildung 5.9*). Damit konnte man die apparenten Sedimentationskoeffizienten der Cytochrom *c*-Oxidase in den beiden System bestimmen: $s = (5,3 \pm 0,2)$ S in „pH 6“ bzw. $s = (6,0 \pm 0,2)$ S in „pH 8“.²¹ Diese *s*-Werte, auf Standardbedingungen (Wasser bei 20°C) umgerechnet, sind im Rahmen der Fehlergrenze identisch: $s_{20,W} = (9,3 \pm 0,6)$ S in „pH 6“; $s_{20,W} = (9,8 \pm 0,6)$ S in „pH 8“ (s. *Abbildung 5.9*). Daraus kann man schließen, daß die Cytochrom *c*-Oxidase im gesamten betrachteten pH- und Ionenstärkebereich insbesondere hinsichtlich der Quartärstruktur identisch ist.

²¹ Nebenbei ergab sich aus der *c*(M) Analyse dieses *s*-Laufs eine (sehr) grobe Abschätzung des Detergensanteils am DDM-Cytochrom *c*-Oxidase-Komplex: Es binden etwa 1,1 g DDM an 1 g Cytochrom *c*-Oxidase (zum Vergleich: 1 g Cytochrom *c*-Oxidase aus Rinderherz bindet 0,55 bis 0,64 g DDM [11] [136]). Dieser Befund deckt sich mit dem Ergebnis von Sone und Takagi in [129], die für die Cytochrom *c*-Oxidase des thermophilen Bakteriums PS3 ebenfalls eine vergleichsweise hohe Hydrophobizität fanden (1,25 g C₁₂E₈ pro g Protein; im Vergleich dazu: 1 g Cytochrom *c*-Oxidase aus Rinderherz bindet nach [129] 0,50 bis 0,70 g C₁₂E₈).

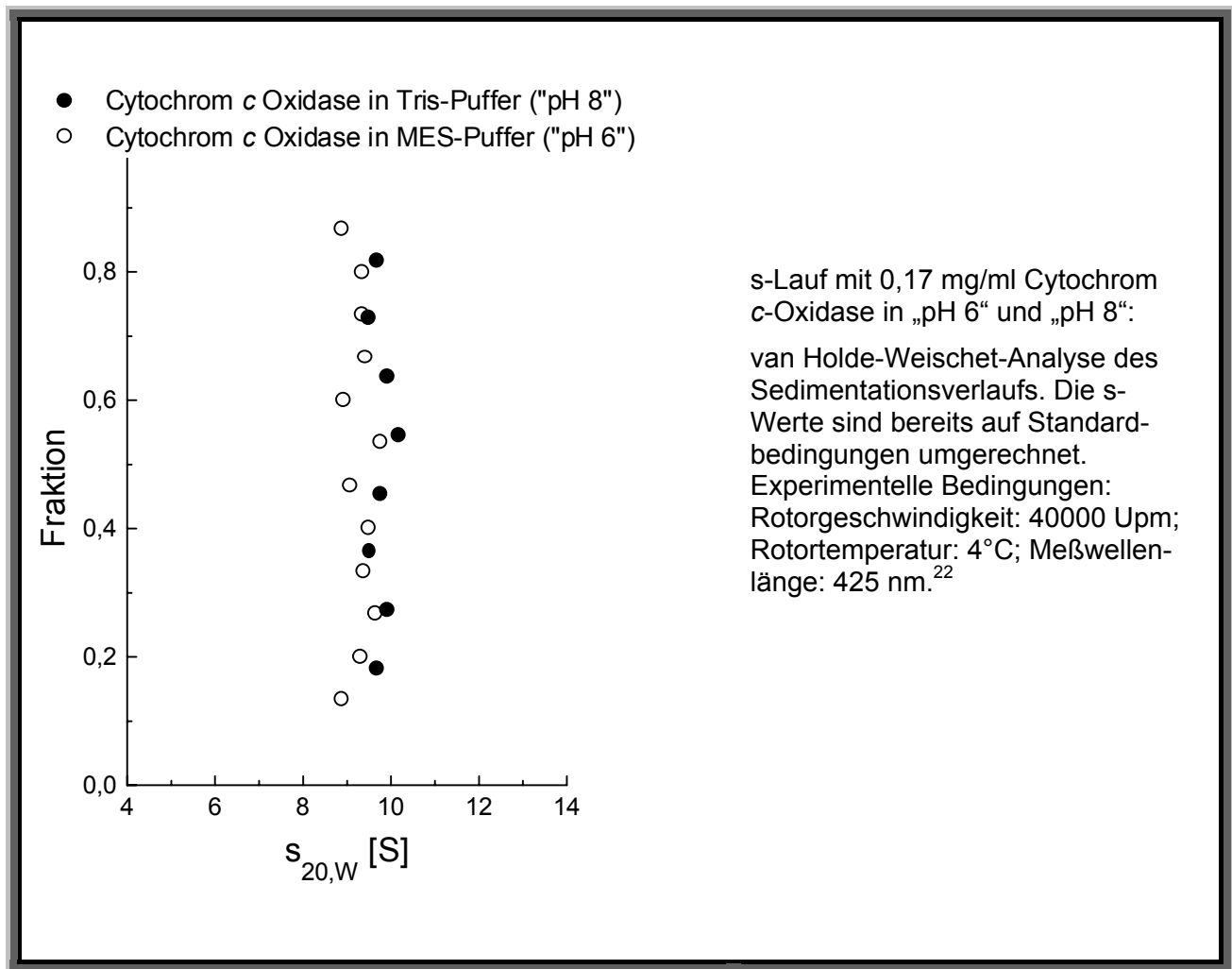


Abbildung 5.9

5.3.2 Cytochrom c-Oxidase als „Testprotein“

Die Eignung als Testprotein ist an eine Reihe von Bedingungen geknüpft: Da das Protein „Modell steht“ für die gesamte Klasse der integralen Membranproteine, soll es – erstens – ein **typischer** Vertreter dieser Klasse sein. Zweitens soll es in solubilisiertem Zustand **robust** sein, einerseits angesichts der verschiedenen Bedingungen, denen es standzuhalten hat, da diese

²² Zur Berechnung von $s_{20,W}$ aus den apparenten Sedimentationskoeffizienten s^* wurden folgende Werte herangezogen: Für „pH 6“ bei 4°C: Dichte: $\rho = 1,014$ g/ml; Viskosität: $\eta = 1,634$ cPoise. Für „pH 8“ bei 4°C: Dichte: $\rho = 1,002$ g/ml; Viskosität: $\eta = 1,578$ cPoise. Für das partialspezifische Volumen der Cytochrom c Oxidase bei 4°C in saccharosefreiem Puffer wurde 0,764 ml/g angenommen (s.u.). ρ und η der beiden Puffer wurden jeweils mit SEDNTERP berechnet. Die mit der Umrechnung von s^* auf $s_{20,W}$ verbundene zusätzliche Ungenauigkeit wird mit $\Delta s = \pm 0,3$ S berücksichtigt.

hier unter methodischen und nicht unter biochemischen Gesichtspunkten betrachtet werden, andererseits im Sinne von „zeitlich stabil“, da Gleichgewichtsanalysen gerade unter Verwendung von viskositätssteigernden Zusätzen wie Saccharose oder Glycerin einige Tage dauern können. Drittens soll das Protein im Hinblick auf die Genauigkeit der zu vergleichenden Ergebnisse eine **einheitlich** sedimentierende Substanz darstellen, aus dem selben Grund ist angezeigt, daß, viertens, die Proteinpräparation eine **reine** Substanz liefert (Reinheit > 95% von der Gesamtaborption). Schließlich ist es günstig, wenn auch für den angestrebten Methodenvergleich nicht zwingend, Quartärstruktur und Molmasse des Proteins zu kennen. Liegen außerdem Werte zum H-D-Austausch am Testprotein vor, erhöht dies die Genauigkeit der Analyse des in Gegenwart von D₂O vorliegenden Proteins.

Sämtliche Bedingungen wurden erfüllt von den Präparaten der Cytochrom *c*-Oxidase von *Paracoccus denitrificans*. Es handelt sich hierbei um ein typisches Membranprotein von in solubilisiertem Zustand derart robuster Natur, daß unter den zu testenden Verhältnissen und im Zeitrahmen der Untersuchungen keinerlei Veränderungen des Proteins zu erwarten waren.²³ Dies wurde von den routinemäßigen Qualitätstests vor und nach den Ultrazentrifugenuntersuchungen bestätigt (selbst das an der Detergensemischung beteiligte LDAO, ein Detergens, das in reiner Form nicht-kovalente Bindungen innerhalb des solubilisierten Protein-Komplexes aufbrechen kann²⁴, verursachte den Tests zufolge keine Schäden am Protein – in Übereinstimmung mit den entsprechenden Ultrazentrifugenuntersuchungen; s.u.). Weiterhin konnte hier die Reinheit des Proteinpräparats nachgewiesen und seine Homogenität bestätigt werden (s. auch die Anpassungen der Gleichgewichtsprofile). Darüber hinaus ist aus der Röntgenbeugungsanalyse der kristallisierten Cytochrom *c*-Oxidase von *Paracoccus denitrificans* bekannt, daß sie eine monomere Substanz darstellt [59]. Das Monomer besteht aus 4 verschiedenen Proteinuntereinheiten und zwei Häm-Gruppen (Häm *a*), seine Molmasse beträgt $M = 128,5$ kDa (Aminosäurezusammensetzung aus: [94] [95] [133] [153] [167]). Aus infrarotspektroskopischen Messungen folgt außerdem ein Deuterierungsgrad der Cytochrom *c*-Oxidase von 70%²⁵, d.h. 70% der austauschbaren H⁺-Ionen werden in 100% D₂O gegen D⁺ ausgetauscht (der Rest wird offenbar vom Detergens abgeschirmt).

²³ Bernd Ludwig, Werner Mänte, persönliche Mitteilungen.

²⁴ Bernd Ludwig, Petra Hellwig, persönliche Mitteilungen.

²⁵ Petra Hellwig, persönliche Mitteilung.

Berechnet man nach der Cohn/ Edsall-Methode [20] [34] aus den Aminosäurezusammensetzungen der einzelnen Untereinheiten das partialspezifische Volumen des Proteinanteils der Cytochrom *c*-Oxidase und kombiniert man diesen Wert nach [34] mit dem partialspezifische Volumen der Häm-Gruppen²⁶, erhält man für das partialspezifische Volumen des gesamten Protein-Pigment-Komplexes $\bar{v}_c = 0,753 \text{ ml/g}$. Korrigiert man diesen für 25°C kalkulierten Wert nach [34], folgt für 4°C ein \bar{v}_c von zwischen 0,732 ml/g und 0,748 ml/g. Nach Mittelung erhält man somit für das errechnete partialspezifische Volumen der Cytochrom *c*-Oxidase bei 4°C $\bar{v}_c = 0,740 \text{ ml/g}$.

5.3.3 Ultrazentrifugenuntersuchung der Cytochrom *c*-Oxidase unter verschiedenen Kompensationsbedingungen

Die Cytochrom *c*-Oxidase wurde sowohl unter der etablierten als auch unter den verschiedenen neuen Dichtekompensationsbedingungen im Sedimentationsgleichgewicht untersucht (Rotortemperatur: 4°C). Die Rotorgeschwindigkeit im Gleichgewicht betrug 20 000 Upm für Cytochrom *c*-Oxidase im Saccharose+D₂O/DDM-System; in allen anderen Fällen wurden als Gleichgewichtsgeschwindigkeit 12 000 Upm gewählt. Die Einstellung des Gleichgewichts wurde z.T. mittels Overspeed zu Beginn eines Laufs beschleunigt. Die Gleichgewichtsprofile wurden bei einer Wellenlänge von 425 nm aufgenommen („step mode“ mit $\Delta r = 0,002 \text{ cm}$; 20-50 „averages“). Anschließend wurde, wie in Kap. 3.4.2 beschrieben, die Basislinie gemessen.

Die Auswertung der Gleichgewichts-A(r)-Profile beruhte auf der Annahme einer homogenen Substanz, die ideales Sedimentationsverhalten zeigt – eine Annahme, die sich in allen Fällen bestätigte. Die Gleichgewichtsdatensätze wurden dementsprechend mit freier Basislinie und einer effektiven Molmasse M_{eff} angepaßt. Durch den Vergleich der errechneten Basis mit der gemessenen wurde die Anpassungsrechnung kontrolliert (die Basisabsorption betrug üblicherweise weniger als 5% von der Gesamtabsorption). Diejenige effektive Molmasse, die einen gegebenen Gleichgewichtsdatensatz bestmöglich erklärt, wurde mit der effektiven Molmasse der Cytochrom *c*-Oxidase identifiziert. Damit ergibt sich für die optimale effektive Molmasse der Anpassung: $M_{\text{eff}} = M(k - \bar{v} \rho)$, wobei M und \bar{v} die Molmasse und das partialspezifische Volumen der Cytochrom *c*-Oxidase bezeichnen, ρ die Dichte des Puffers benennt

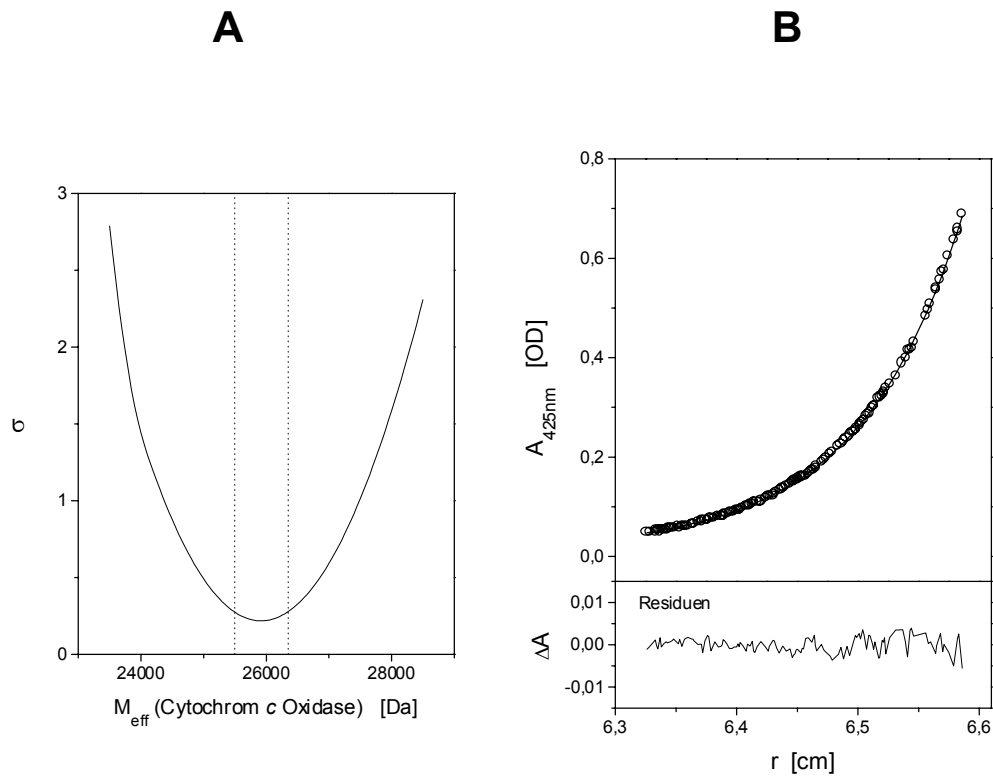
²⁶ Eine von Helmut Durchschlag durchgeführte Schätzung des partialspezifischen Volumens von Hämgruppen ergab für 25°C $\bar{v}_{\text{Häm}} \approx 0,82 \text{ ml/g}$ (unveröffentlichter Wert). Die Schätzung beruhte auf der in [33] dargestellten Addition von Volumeninkrementen.

und k die Korrektur des gegebenenfalls am Protein erfolgten H-D-Austauschs beinhaltet.²⁷ Aus dem ermittelten M_{eff} sowie der bekannten Molmasse des Cytochrom c -Oxidase-Monomers (128,5 kDa) und den ebenfalls extern bestimmten Werten für k und ρ erhält man das partialspezifische Volumen der Cytochrom c -Oxidase, wie es bei gegebener Kompensationsmethode erscheint. Über die so ermittelten \bar{v} -Werte wurden schließlich die verschiedenen Kompensationsmethoden verglichen.

In *Abbildung 5.10* ist an einem typischen Gleichgewichtsprofil die Ultrazentrifugalanalyse der Cytochrom c -Oxidase umfassend dargestellt: Man sieht die Abhängigkeit der Fehlerquadratsumme der Anpassung, σ , von der für die Cytochrom c -Oxidase angenommenen effektiven Molmasse (*Abbildung 5.10A*). Mit dem aus dem Minimum dieser Funktion abgeleiteten „wahren“ M_{eff} , dessen statistischer Fehler in *Abbildung 5.10A* angedeutet ist²⁸, wurde die in *Abbildung 5.10B* gezeigte Anpassung der Meßdaten durchgeführt. Die Residuen dieser Anpassung sind statistisch um „0“ verteilt, was die Annahme einer einheitlichen, ideal sedimentierenden Substanz bestätigt.

²⁷ In 100% D₂O und bei einem Deuterierungsgrad von 100% (d.h. ohne Abschirmung von H-D-Austauschfähigen Gruppen durch Detergens) beträgt nach [35] k durchschnittlich 1,0155; ohne H-D-Austausch gilt: $k = 1$ (vgl. auch [151]).

²⁸ Der statistische Fehler der effektiven Molmasse beträgt in diesem Beispiel weniger als ± 500 Da. Da immer mehrere Datensätze einer Cytochrom c -Oxidase-Probe analysiert wurden, reduzierte sich der M_{eff} -Fehler entsprechend; in allen nachfolgend beschriebenen Fällen war er dadurch kleiner als ± 400 Da.



Sedimentationsgleichgewichtsanalyse von Cytochrom c-Oxidase in $C_{12}E_9$ -Lösung bei Dichtekompensation durch D_2O :

Das im Sedimentationsgleichgewicht gemessene $A(r)$ -Profil (o in **B**) wurde mit freier Basislinie und einer effektiven Molmasse M_{eff} angepaßt. **A** zeigt die Fehlerquadratsumme σ in Abhängigkeit von der angenommenen effektiven Molmasse von Cytochrom c-Oxidase (—). $M_{\text{eff}} = 25,9$ kDa lieferte die beste Anpassung (— in **B** oben); deren Residuen (**B** unten) sind statistisch um $\Delta A = 0$ verteilt. Der statistische Fehler der optimalen effektiven Molmasse ist durch die gepunkteten Linien in **A** dargestellt.

Proteinkonzentration: ca. 0,2 mg/ml. Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,3% (w/v) $C_{12}E_9$; 46/54 (v/v) D_2O/H_2O . Experimentelle Bedingungen: Rotorgeschwindigkeit 12000 Upm; Rotortemperatur 4°C; Meßwellenlänge 425 nm.

Abbildung 5.10

5.3.3.1 Ultrazentrifugenuntersuchung der Cytochrom c-Oxidase in Gegenwart von $C_{12}E_9$

Die in $C_{12}E_9$ -Lösung überführte Cytochrom c-Oxidase wurde unter der auf verschiedene Art hergestellten Bedingung der Dichtekompensation im Sedimentationsgleichgewicht untersucht.

Abbildung 5.10 zeigt eine Analyse des in folgender Lösung vorliegenden Enzyms:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

50 mM NaCl

0,5 mM EDTA

0,3% (w/v) C₁₂E₉

46/54 (v/v) D₂O/H₂O

Diese Lösung enthielt pro ml ca. 0,2 mg Cytochrom *c*-Oxidase; sie wurde insgesamt in drei Probenkammern untersucht (Füllvolumen: 135-140 µl pro Kammer). Faßt man die Analyseergebnisse zu den drei Kammern zusammen, erhält man für die effektive Molmasse des Proteins $M_{\text{eff}} = 26,1 \text{ kDa}$, wodurch sich mit $k = 1,0050$ ²⁹ und $\rho = 1,050 \text{ g/ml}$ für das partialspezifische Volumen der (undeutierten) Cytochrom *c*-Oxidase in wässriger Lösung $\bar{v} = \mathbf{0,764 \text{ ml/g}}$ ergibt. Dieser über Dichtekompensation mittels D₂O, also über das Standardverfahren zustandegekommene Wert dient als Bezugspunkt für die mit den neuen Methoden ermittelten \bar{v} -Werte.

Die Cytochrom *c*-Oxidase wurde weiter in Gegenwart von mit Saccharose bzw. Glycerin kompensiertem C₁₂E₉ untersucht (s. *Abbildung 5.11*). Hier lag das Protein in folgenden Lösungen vor:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

50 mM NaCl

0,5 mM EDTA

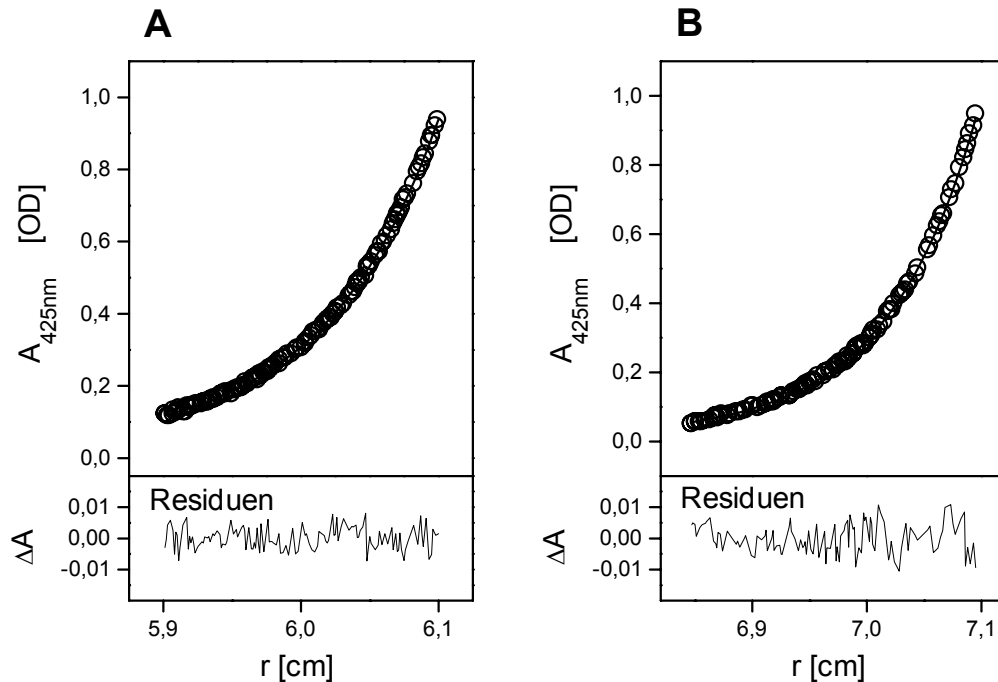
0,3% (w/v) C₁₂E₉

6,4% (w/v) Saccharose **oder** 13,2% (w/v) Glycerin

Die Lösungen enthielten pro ml ca. 0,2 mg Cytochrom *c*-Oxidase. Das Enzym wurde insgesamt in sechs Probenkammern untersucht (Füllvolumen: 135-140 µl pro Kammer), wobei drei Kammern die saccharosehaltige und drei Kammern die glyzerinhaltige Lösung beinhalten. Mit Saccharose als Densifier erhielt man $M_{\text{eff}} = 27,3 \text{ kDa}$, woraus mit $\rho = 1,028 \text{ g/ml}$ folgt: $\bar{v} = \mathbf{0,766 \text{ ml/g}}$. Mit Glycerin ergab sich: $M_{\text{eff}} = 26,8 \text{ kDa}$, was mit $\rho = 1,033 \text{ g/ml}$ ebenfalls zu $\bar{v} = \mathbf{0,766 \text{ ml/g}}$ führt.

Aus *Abbildung 5.11* geht hervor, daß die in C₁₂E₉-Lösung vorliegende Cytochrom *c*-Oxidase auch in Gegenwart von Saccharose bzw. Glycerin eine einheitliche, ideal sedimentierende Substanz darstellt.

²⁹ k-Berechnung nach [35] bzw. [151] mit Deuterierungsgrad = 70% und 46% D₂O.



Ultrazentrifugenanalyse von Cytochrom *c*-Oxidase in C₁₂E₉-Lösung; Dichtekompensation mittels Saccharose bzw. Glycerin

Die im Sedimentationsgleichgewicht gemessenen $A(r)$ -Profile wurden jeweils mit Basislinie und einer effektiven Molmasse angepaßt. Oben: experimentelle Daten (\circ) und optimaler Fit (—). Unten: Residuen der Anpassungen. Proteinkonzentration: ca. 0,2 mg Cytochrom *c*-Oxidase pro ml. Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,3% (w/v) C₁₂E₉; 6,4% (w/v) Saccharose (**A**) bzw. 13,2% (w/v) Glycerin (**B**). Experimentelle Bedingungen: Rotorgeschwindigkeit 12000 Upm; Rotortemperatur 4°C; Meßwellenlänge 425 nm.

Abbildung 5.11

Die Experimente mit 0,2 mg/ml Cytochrom *c*-Oxidase in D₂O- saccharose- und glycerin- haltiger C₁₂E₉-Lösung wurden mit 0,1 mg/ml Cytochrom *c*-Oxidase wiederholt. Die ver- änderte Proteinkonzentration führte in keinem Fall zu anderen Ergebnissen: Die Datensätze ließen sich sehr gut mit einer einzigen effektiven Molmasse anpassen, für M_{eff} ergaben sich innerhalb des Fehlers die für die doppelte Konzentration ermittelten Werte (Daten nicht gezeigt). Da \bar{v} in verdünnten Proteinlösungen unabhängig von der Proteinkonzentration ist, bestätigt dies die Voraussetzung $M = \text{konstant}$.

5.3.3.2 Ultrazentrifugenuntersuchung der Cytochrom *c*-Oxidase in Gegenwart von rTX-100

Die Cytochrom *c*-Oxidase wurde in Gegenwart von mit Saccharose bzw. Glycerin kompen-
siertem rTX-100 im Sedimentationsgleichgewicht untersucht (s. *Abbildung 5.12*). Das Protein
befand sich hierfür in folgenden Lösungen:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

50 mM NaCl

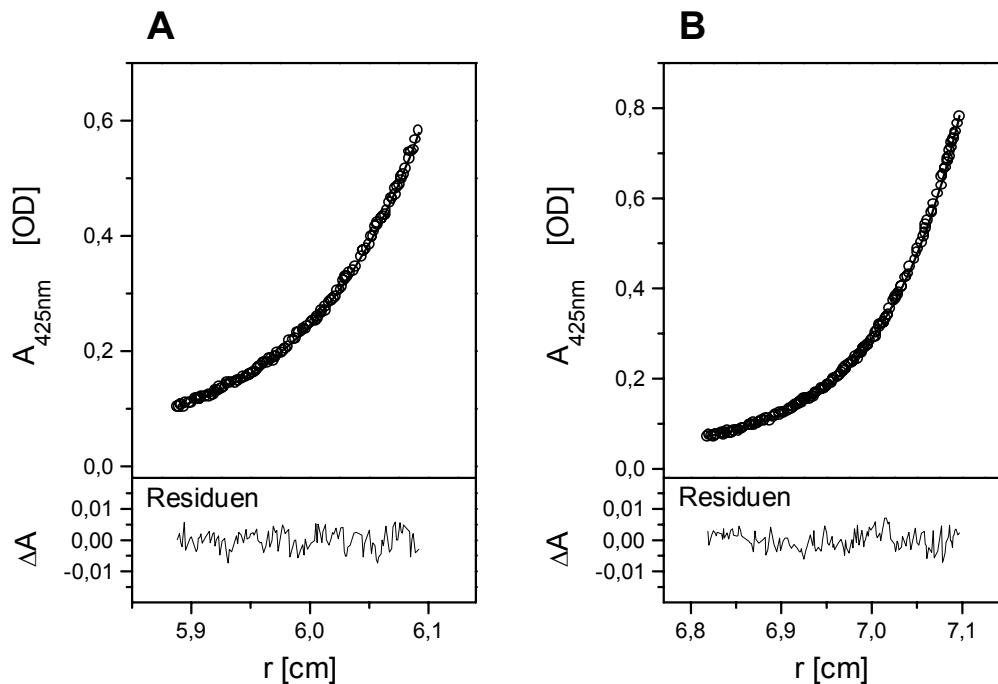
0,5 mM EDTA

0,3% (w/v) rTX-100

9,7% (w/v) Saccharose **oder** 23,0% (w/v) Glycerin

Die Lösungen enthielten pro ml ca. 0,2 mg Cytochrom *c*-Oxidase. Das Enzym wurde insge-
samt in sechs Probenkammern untersucht (Füllvolumen: 135-140 μ l pro Kammer), wobei drei
Kammern die saccharosehaltige und drei Kammern die glyzerinhaltige Lösung enthielten. Mit
Saccharose als Densifier erhielt man $M_{\text{eff}} = 24,6$ kDa, woraus mit $\rho = 1,043$ g/ml folgt: $\bar{v} =$
0,775 ml/g. Mit Glycerin ergab sich: $M_{\text{eff}} = 24,3$ kDa, was mit $\rho = 1,054$ g/ml zu $\bar{v} =$
0,769 ml/g führt.

Abbildung 5.12 zeigt, daß die in rTX-100-Lösung vorliegende Cytochrom *c*-Oxidase sowohl
mit Saccharose als auch mit Glycerin als Densifier eine einheitliche, ideal sedimentierende
Substanz darstellt.



Ultrazentrifugenanalyse von Cytochrom c-Oxidase in rTX-100-Lösung; Dichtekompensation mittels Saccharose bzw. Glycerin

Die im Sedimentationsgleichgewicht gemessenen $A(r)$ -Profile wurden jeweils mit Basislinie und einer effektiven Molmasse angepaßt. Oben: experimentelle Daten (\circ) und optimaler Fit (—). Unten: Residuen der Anpassungen. Proteinkonzentration: ca. 0,2 mg Cytochrom c-Oxidase pro ml. Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,3% (w/v) rTX-100; 9,7% (w/v) Saccharose (**A**) bzw. 23,0% (w/v) Glycerin (**B**). Experimentelle Bedingungen: Rotorgeschwindigkeit 12000 Upm; Rotortemperatur 4°C; Meßwellenlänge 425 nm.

Abbildung 5.12

5.3.3.3 Ultrazentrifugenuntersuchung der Cytochrom c-Oxidase in Gegenwart von DDM

Die Sedimentationsgleichgewichtsuntersuchungen von in DDM-Lösung präparierter Cytochrom c-Oxidase wurden zum einen im Tris/NaCl/EDTA-System durchgeführt. Der Kompensationspuffer:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

50 mM NaCl

0,5 mM EDTA

0,02% (w/v) DDM

30,2% (w/v) Saccharose

95/5 (v/v) D₂O/H₂O

Die Untersuchung dieser Lösung wurde in drei Probenkammern (0,1 mg Cytochrom *c*-Oxidase pro ml; 110 µl Probe pro Kammer) durchgeführt, ein Beispiel ist in *Abbildung 5.13* dargestellt. Die Mittelung der drei Analyseergebnisse ergab eine effektive Molmasse des Proteins von $M_{\text{eff}} = 7,9$ kDa. Damit folgt mit $k = 1,0103$ ³⁰ und $\rho = 1,201$ g/ml für das partial-spezifische Volumen der (undeutierten) Cytochrom *c*-Oxidase: $\bar{v} = \mathbf{0,790\ ml/g}$.

³⁰ k-Berechnung nach [35] bzw. [151] mit Deuterierungsgrad = 70% und 95% D₂O.

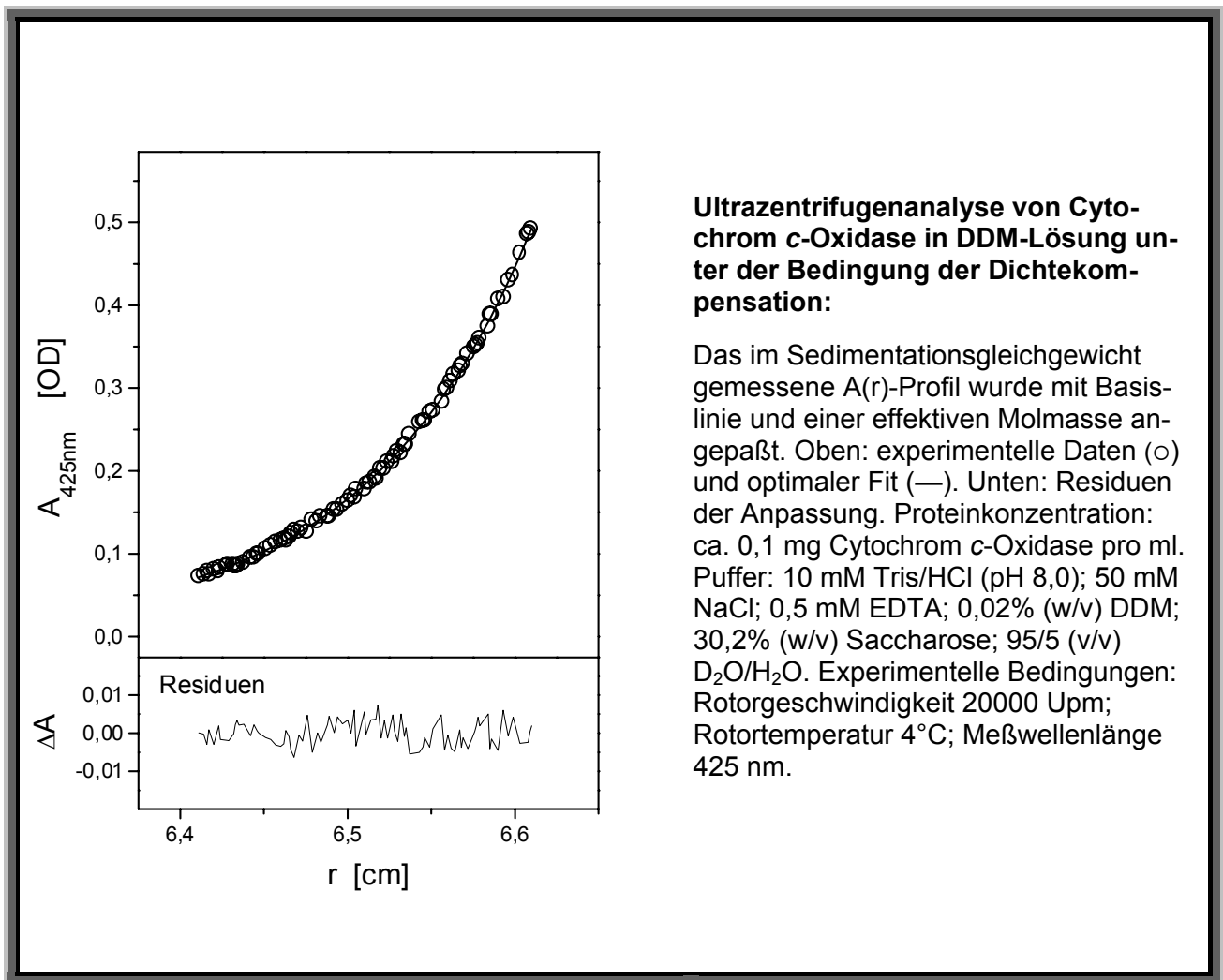
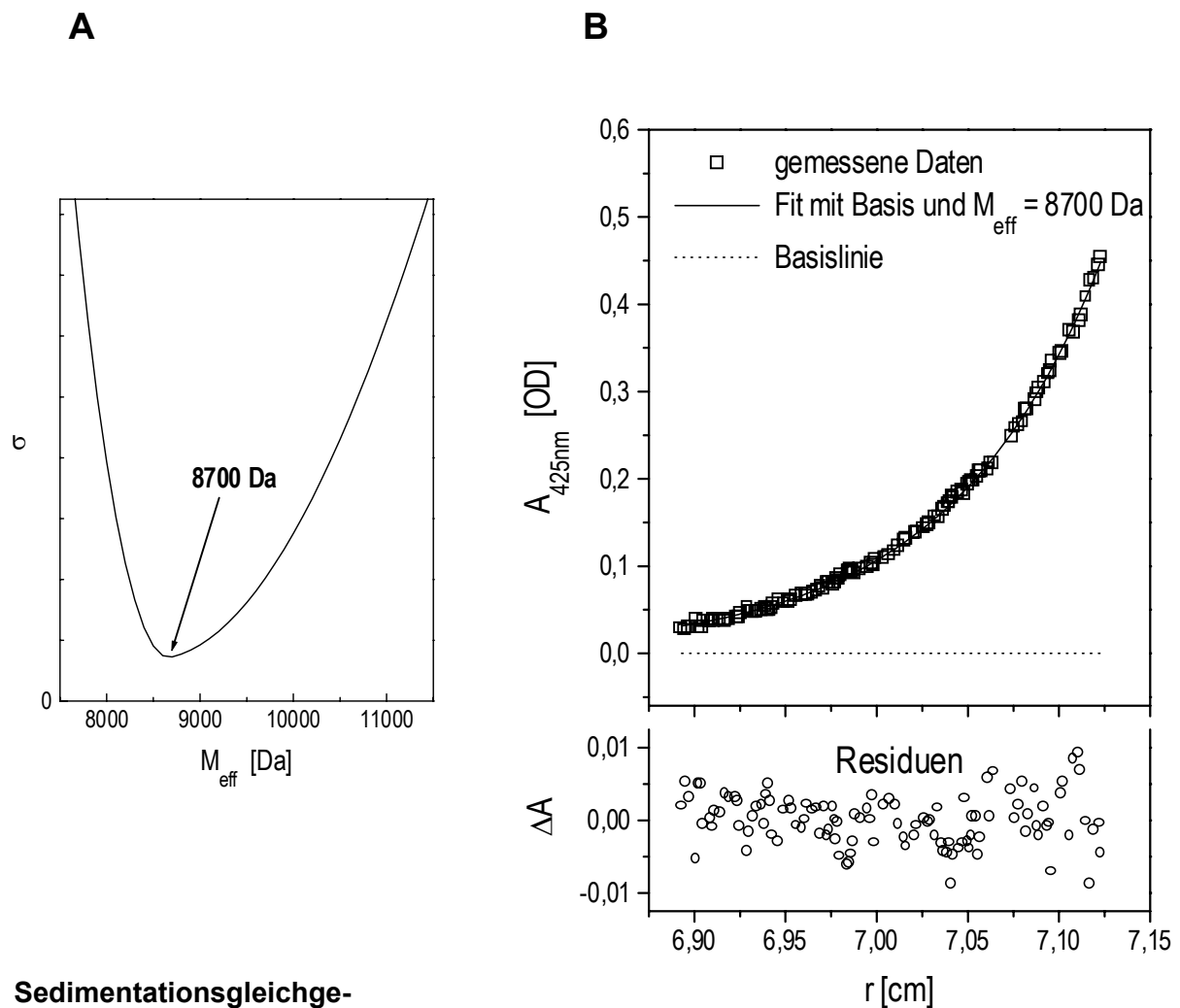


Abbildung 5.13

Außerdem wurde das Cytochrom *c*-Oxidase- \bar{v} im MES/NaCl-System bestimmt, worin der bc_1 -Komplex präpariert werden sollte. Der Kompensationspuffer:

- 50 mM MES/NaOH (pH 6,0)
- 300 mM NaCl
- 0,02% (w/v) DDM
- 27,6% (w/v) Saccharose
- 95/5 (v/v) D_2O/H_2O

Die Untersuchung von 3 Cytochrom *c*-Oxidase-Proben (0,1 mg Protein pro ml; 110 μ l Probe pro Kammer) ergab eine effektive Molmasse des Enzyms von $M_{\text{eff}} = (8,6 \pm 0,1)$ kDa (s. *Abbildung 5.14A*). Damit folgt mit $k = 1,0103$ und $\rho = 1,207$ g/ml für das partialspezifische Volumen der – undeuterten – Cytochrom *c*-Oxidase: $\bar{v} = \mathbf{0,782 \text{ ml/g}}$.



Sedimentationsgleichgewichtsanalyse von Cytochrom c-Oxidase in dichte kompensierter DDM-Lösung:

Das im Sedimentationsgleichgewicht gemessene $A(r)$ -Profil (□ in **B**) wurde mit Basislinie und einer effektiven Molmasse M_{eff} angepaßt. **A** zeigt die Fehlerquadratsumme σ in Abhängigkeit von M_{eff} . $M_{\text{eff}} = 8,7$ kDa lieferte den besten Fit (— in **B**). Die Residuen der Anpassung (o in **B**) sind statistisch um $\Delta A = 0$ verteilt.

Proteinkonzentration: ca. 0,1 mg Cytochrom c-Oxidase pro ml. Puffer: 50 mM MES/NaOH (pH 6); 300 mM NaCl; 0,02% (w/v) DDM; 27,6% (w/v) Saccharose; 95/5 (v/v) D_2O/H_2O . Experimentelle Bedingungen: Rotorgeschwindigkeit: 20000 Upm; Rotortemperatur: 4°C; Meßwellenlänge: 425 nm.

Abbildung 5.14

Die von der hohen DDM-Dichte geforderte hohe Saccharosekonzentration mag im Einzelfall zur Proteinstabilisierung erwünscht, wenn nicht notwendig sein – die Mehrzahl ihrer Nebenwirkungen ist von Nachteil:

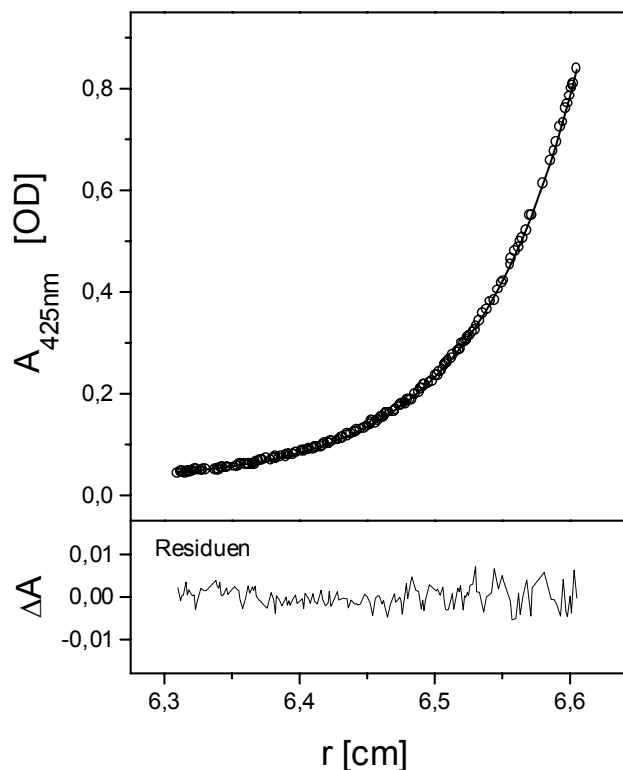
- Eine hohe Saccharosekonzentration erhöht offenbar das partialspezifische Volumen eines Proteins signifikant. Darüber hinaus ist eine Gleichgewichtsanalyse allerdings nicht beeinträchtigt, wie den sehr guten Anpassungen in *Abbildung 5.13* und *Abbildung 5.14B* zu entnehmen ist: Demnach stellt das Testprotein auch bei hoher Saccharosekonzentration eine homogene Substanz dar, die ideal sedimentiert.
- Eine hohe Saccharosekonzentration bewirkt eine hohe Viskosität des Puffers. So waren mindestens 70 h zur Einstellung des Sedimentationsgleichgewichts nötig – trotz Overspeed zu Laufbeginn. Da die in DDM solubilisierter Cytochrom *c*-Oxidase über viele Tage hinweg stabil war, blieb dies im vorliegenden Fall folgenlos.
- Einer hohen Saccharosekonzentration entspricht eine mitunter deutlich meßbare Ansammlung von Verunreinigungen aus der verwendeten Saccharosecharge. Derartige Verunreinigungen können, da sie oftmals im UV-Bereich stark absorbieren, absorptionsspektroskopische Analysen stören. Dies spielt allerdings im Falle der Untersuchung von im sichtbaren Wellenlängenbereich absorbierenden Objekten (Cytochrom *c*-Oxidase, *bc*₁-Komplex) keine Rolle.

5.3.3.4 Ultrazentrifugenuntersuchung der Cytochrom *c*-Oxidase in Gegenwart der Detergensemischung

Die Cytochrom *c*-Oxidase wurde in folgender LDAO-C₁₂E₉-Lösung untersucht:

- 10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
- 50 mM NaCl
- 0,5 mM EDTA
- 0,3% (w/v) Detergens (40/60 (w/w) LDAO/C₁₂E₉)

Die Sedimentationsgleichgewichtsanalyse dieser Lösung, die pro ml 0,2 mg Cytochrom *c*-Oxidase enthielt, in drei Probenkammern (Füllvolumen: 135-140 µl pro Kammer) lieferte $M_{\text{eff}} = 28,9 \text{ kDa}$ (*Abbildung 5.15* zeigt einen Datensatz mit Anpassung und Residuen). Daraus folgt mit $\rho = 1,003 \text{ g/ml}$: $\bar{v} = \mathbf{0,773 \text{ ml/g}}$.



Ultrazentrifugalanalyse von Cytochrom *c*-Oxidase in Gegenwart der LDAO- $C_{12}E_9$ -Mischung unter der Bedingung der Dichtekompensation:

Das im Sedimentationsgleichgewicht gemessene $A(r)$ -Profil wurde mit Basislinie und einer effektiven Molmasse angepasst. Oben: experimentelle Daten (\circ) und optimaler Fit (—). Unten: Residuen der Anpassung. Proteinkonzentration: ca. 0,2 mg Cytochrom *c*-Oxidase pro ml. Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,3% (w/v) Detergens (40/60 (w/w) LDAO/ $C_{12}E_9$). Experimentelle Bedingungen: Rotorgeschwindigkeit 12000 Upm; Rotortemperatur 4°C; Meßwellenlänge 425 nm.

Abbildung 5.15

LDAO ist in der Lage, die Untereinheiten III und IV der Cytochrom *c*-Oxidase abzutrennen³¹. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, daß LDAO auch mit $C_{12}E_9$ -Beimischung eine derartige Wirkung entfaltet. Den Aktivitätstests zufolge gab es allerdings keinen Unterschied zwischen der Cytochrom *c*-Oxidase in Gegenwart der LDAO- $C_{12}E_9$ -Mischung und der in $C_{12}E_9$, rTX-100 oder DDM-Lösung vorliegenden. Dies wurde durch die Gleichgewichtsanalyse bestätigt: Die Cytochrom *c*-Oxidase zeigte sich in LDAO- $C_{12}E_9$ -Lösung als homogene, ideal sedimentierende Substanz (s. *Abbildung 5.15*) mit einem \bar{v} -Wert, der sich im Rahmen des Meßfehlers (s.u.) nicht von dem unter Standardbedingungen bestimmten unterscheidet. Dagegen würde sich ein Zerfall des Protein-Pigment-Komplexes im Gleichgewichts-

³¹ Bernd Ludwig, Petra Hellwig, persönliche Mitteilungen.

profil sowohl als Inhomogenität als auch als signifikante \bar{v} -Erhöhung bemerkbar machen (das erhöhte \bar{v} wäre nur ein scheinbares, da seine Berechnung auf falschen Voraussetzungen beruhte). Da somit die Cytochrom *c*-Oxidase in Gegenwart der Detergensemischung trotz LDAO als intakt gelten muß, läßt sich schließen, daß der hohe C₁₂E₉-Anteil entscheidend zerfallshemmend wirkt.

Zur Möglichkeit einer fehlerhaften Kompensation aufgrund bevorzugter Bindung eines der beiden Detergenzien an das Protein sei bemerkt, daß – bei einem Massenverhältnis zwischen proteingebundenem Detergens und Protein von 0,5 – eine Fehlkompensation um $\pm 0,02$ g/ml einen Fehler in der Molmasse des Proteins von (lediglich) etwa $\pm 4\%$ verursacht [81].

5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich der Methoden

Die beiden folgenden Tabellen bieten einen Überblick über die Resultate dieses Abschnitts:

Tabelle 5-3

System	Kompensations- bedingung	$\rho(4^\circ\text{C})$ [g/ml]	$\eta(4^\circ\text{C})$ [cPoise]
Densifier / Detergens			
D ₂ O / C ₁₂ E ₉	46/54 (v/v) D ₂ O/H ₂ O	1,050	1,81
Saccharose / C ₁₂ E ₉	6,4% (w/v) Saccharose	1,028	1,93
Glyzerin / C ₁₂ E ₉	13,2% (w/v) Glyzerin	1,033	2,29
Saccharose / rTX-100	9,7% (w/v) Saccharose	1,043	2,17
Glyzerin / rTX-100	23,0% (w/v) Glyzerin	1,054	3,02
Saccharose+D ₂ O / DDM (Tris)	30,2% (w/v) Saccharose 95/5 (v/v) D ₂ O/H ₂ O	1,201	
Saccharose+D ₂ O / DDM (MES)	27,6% (w/v) Saccharose 95/5 (v/v) D ₂ O/H ₂ O	1,207	
Detergens / Detergens			
LDAO / C ₁₂ E ₉	40/60 bis 45/55 (w/w) LDAO/C ₁₂ E ₉	1,003	1,59

Tabelle 5-4

System	M_{eff} [kDa]	\bar{v} [ml/g]
Densifier / Detergens		
D ₂ O / C ₁₂ E ₉	26,1	0,764
Saccharose / C ₁₂ E ₉	27,3	0,766
Glyzerin / C ₁₂ E ₉	26,8	0,766
Saccharose / rTX-100	24,6	0,775
Glyzerin / rTX-100	24,3	0,769
Saccharose+D ₂ O / DDM (Tris)	7,9	0,790
Saccharose+D ₂ O / DDM (MES)	8,6	0,782
Detergens / Detergens		
LDAO / C ₁₂ E ₉	28,9	0,773

In *Tabelle 5-4* sind die Ergebnisse der Gleichgewichtsuntersuchungen der Cytochrom *c*-Oxidase in Abhängigkeit von den verschiedenen Methoden zur Kompensation von Detergensedichten zusammengestellt. Die in *Tabelle 5-4* als „D₂O/C₁₂E₉“-System gekennzeichnete – etablierte – Methode liefert mit dem partialspezifischen Volumen der Cytochrom *c*-Oxidase, \bar{v} , den Beurteilungsmaßstab für die übrigen Methoden. Der Tabelle läßt sich entnehmen, daß angesichts eines relativen \bar{v} -Fehlers von etwa $\pm 1\%$ ³² in den Systemen „Saccharose/C₁₂E₉“, „Glyzerin/C₁₂E₉“, „Saccharose/rTX-100“ und „Glyzerin/rTX-100“, sowie in Gegenwart der Detergensemischung das Protein- \bar{v} aus der etablierten Methode reproduziert wurde. Von diesem \bar{v} unterscheidet sich das aus der Dichtekompensation von DDM hervorgehende signifikant. Im Falle einer Sedimentationsgleichgewichtsanalyse eines integralen Membranproteins in dichtekompensierter DDM-Lösung ist damit eine Korrektur des Protein- \bar{v} vonnöten.

Die gemessenen, in *Tabelle 5-4* aufgeführten \bar{v} -Werte der Cytochrom *c*-Oxidase sind allesamt signifikant höher als das berechnete partialspezifische Volumen \bar{v}_c , welches nach Temperaturkorrektur zwischen 0,732 ml/g und 0,748 ml/g liegt. Da die Erfahrung mit anderen

³² Für die Berechnung des \bar{v} -Fehlers nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz wurden folgende Abschätzungen eingesetzt: Für das System „Saccharose+D₂O/DDM“: $\Delta M_{\text{eff}}/M_{\text{eff}} = 4\%$; $\Delta M/M = 4\%$; $\Delta k/k = 0,1\%$; $\Delta \rho/\rho = 0,2\%$. Für alle anderen Systeme: $\Delta M_{\text{eff}}/M_{\text{eff}} = 1,5\%$; $\Delta M/M = 2\%$; $\Delta k/k = 0,05\%$; $\Delta \rho/\rho = 0,1\%$. Kompensationsfehler sind in ΔM berücksichtigt. In allen Fällen ergab sich in etwa der gleiche \bar{v} -Fehler.

Protein-Pigment-Komplexen zeigt, daß die berechneten \bar{v} -Werte bezogen auf die gemessenen generell zu niedrig sind [34] [118] [150], wird \bar{v}_c nicht als geeigneter Vergleichsmaßstab angesehen.

Der Vergleich der \bar{v} -Werte aus *Tabelle 5-4* entscheidet über die prinzipielle Verlässlichkeit der neuen Methoden. Ist diese Frage entschieden, steht der Methodenvergleich anhand von Praktikabilitätskriterien an. In diesem Sinne sind in *Tabelle 5-3* die Dichten ρ und die dynamischen Viskositäten η der verwendeten Kompensationslösungen aufgelistet. Während die Lösungsdichte nur dann zur kritischen Größe wird, wenn sie in der Größenordnung des Untersuchungsobjekts liegt, d.h. wenn sie dessen effektive Molmasse minimiert, ist die Viskosität von allgemeinerem Interesse: Sie entscheidet über die Gleichgewichtseinstellungsdauer und damit über den Zeitrahmen der Ultrazentrifugenuntersuchung. Dementsprechend benötigte die Cytochrom *c*-Oxidase bis zum Gleichgewicht zwischen 40 h ohne Overspeedtechnik im „LDAO/C₁₂E₉“-System und mehr als 70 h mit Overspeed in „Saccharose+D₂O/DDM“.

5.5 Diskussion

Die Untersuchung des Modellproteins Cytochrom *c*-Oxidase unter Verwendung der verschiedenen Kompensationsmethoden – einschließlich einer gängigen, etablierten Methode als Maßstab für die anderen – ergab, daß die Dichtekompensation von C₁₂E₉ und rTX-100 mittels Saccharose bzw. Glycerin die Meßgrößen einer Sedimentationsgleichgewichtsanalyse von integralen Membranproteinen nicht bzw. nicht wesentlich verfälscht. Nämliches gilt für die Dichtekompensation von C₁₂E₉ durch Beimischen von LDAO. Die Dichtekompensation von DDM ist allerdings kritisch: Aufgrund der hohen DDM-Dichte wurde von vornherein davon abgesehen, die Kompensation dieser Dichte allein mittels Saccharose oder Glycerin auf die Ultrazentrifugenuntersuchung von Proteinen anzuwenden. Stattdessen wurde Saccharose, der effektivste der in dieser Arbeit verwendeten Densifier, mit D₂O kombiniert. Die Anwesenheit der Cytochrom *c*-Oxidase im resultierenden Kompensationspuffer erhöhte ihr partialspezifisches Volumen signifikant, eine Anwendung dieser Methode erfordert also eine \bar{v} -Korrektur.

Tabelle 5-5

Saccharose- konzentration		\bar{V} Cytochrom <i>c</i> -Oxidase	Glyzerin- konzentration		\bar{V} Cytochrom <i>c</i> -Oxidase
0	% (w/v)	0,764 ml/g	0	% (w/v)	0,764 ml/g
6,4	% (w/v)	0,766 ml/g	13,2	% (w/v)	0,766 ml/g
9,7	% (w/v)	0,775 ml/g	23,0	% (w/v)	0,769 ml/g
30,2	% (w/v)	0,790 ml/g			

Die Unbedenklichkeit der Verwendung von Saccharose und Glyzerin als Densifier ist sicher nicht an die chemische Natur der zu kompensierenden Detergenzien geknüpft, entscheidend ist vielmehr deren Dichte, weil sie die Densifikonzentration bestimmt. *Tabelle 5-5* verdeutlicht die Tendenz des Protein- \bar{V} , mit zunehmender Densifikonzentration zu wachsen, was an die Wirkung von Saccharose und Glyzerin auf die Mizellen-Schwimmdichte erinnert. Da die \bar{V} -Änderung im Falle von C₁₂E₉ und rTX-100, gemessen an der Genauigkeit der Methode, unwesentlich ist, folgt, daß Saccharose und Glyzerin generell zur Kompensation von Detergensdichten bis ca. $\rho = 1,1$ g/ml ohne Korrekturbedarf eingesetzt werden können (mit $\rho(\text{C}_{12}\text{E}_9) < \rho(\text{rTX-100}) \approx 1,1$ g/ml). Dabei dürfte gemäß *Tabelle 5-5* die Kompensation einer Detergensdichte von etwa 1,1 g/ml mit Glyzerin etwas vorteilhafter sein als mit Saccharose. Dies entspricht der Beobachtung, daß der Einfluß von Saccharose auf die Mizellen-Schwimmdichte deutlicher ausfällt als derjenige von Glyzerin.

5.5.1 Kompensation niedriger bis mittlerer Detergensdichten

Da offenbar, gemessen am Ergebnis einer Gleichgewichtsanalyse von integralen Membranproteinen, die Verwendung von Saccharose oder Glyzerin als Kompensationsmittel bis zu einer Detergensdichte von etwa 1,1 g/ml äquivalent ist zur standardmäßigen Verwendung von D₂O³³ als Densifier, besteht im Gültigkeitsbereich dieser Äquivalenz die Freiheit, sich je nach Praktikabilität und sonstigen Gesichtspunkten für die eine oder andere Methode zu entscheiden. Dabei spricht wenig gegen und einiges für Saccharose bzw. Glyzerin. Ein Nachteil ist die Eigenschaft speziell von Saccharose, bei hohen Drehzahlen einen Dichtegradient zu

³³ Die Verwendung des sehr teuren D₂¹⁸O braucht infolge zur Zeit fehlender kommerzieller D₂¹⁸O-Quellen nicht diskutiert zu werden.

bilden. Dies beeinträchtigt prinzipiell die Analyse, ist allerdings für die Praxis wenig relevant, da Gleichgewichtsanalysen an Proteinen in den meisten Fällen im Drehzahlbereich bis ca. 20 000 Upm stattfinden; wie gezeigt wurde, entsteht in diesem Bereich kein signifikanter Densifier- und damit Dichtegradient. Der wesentliche Nachteil von Saccharose und Glycerin besteht im Umstand, daß sie die Viskosität einer Lösung, deren Bestandteil sie sind, deutlich erhöhen (s. *Tabelle 5-3*). Somit erhöhen sie den Zeitbedarf für eine Sedimentationsgleichgewichtsuntersuchung, da eine höhere Viskosität die Gleichgewichtseinstellung verzögert (Overspeed zu Beginn eines Laufs mildert diesen Nachteil, verhindert ihn aber nicht, da diese Technik generell eingesetzt werden kann.). Die Verlängerung der Untersuchungsdauer macht sich insbesondere im Fall sich langsam verändernder/ denaturierender Proteinproben negativ bemerkbar. Einerseits erhöht also die Gegenwart von Saccharose oder Glycerin die Anforderungen an die Stabilität eines Präparats. Andererseits stehen eben diese beiden Substanzen im Ruf, den nativen Zustand von Proteinen zu stabilisieren (durch Entzug von Hydratwasser mit der Folge, daß der hydrophile Teil der Proteinoberfläche kontrahiert, wodurch er entfaltenden Einflüssen mehr Widerstand entgegensetzt [43] [70]). In welchem Maße diese stabilisierende Wirkung die Alterung eines Präparats verzögert und wie sich diese Verzögerung zur längeren Untersuchungsdauer verhält, ist sicherlich von Fall zu Fall verschieden. Damit ist der vielfach dokumentierte schützende Einfluß von Saccharose und Glycerin auf Proteine [12] [19] [42] [43] [44] [60] [70] [144] ein Vorteil, der im Einzelfall zum Tragen kommen kann – allerdings nur im Einzelfall. Dagegen sind die im Folgenden aufgeführten Vorzüge der beiden Densifier allgemeinerer Natur: Zum einen sind Saccharose und Glycerin kostengünstig, sie gehören zur Grundausstattung biochemischen Arbeitens. Zum zweiten sind sie sehr bequem zu handhaben, ihre Verwendung als Densifier birgt im niedrigen bis mittleren Dichtebereich keinerlei Komplikationen in sich. Drittens erfordern sie im Gegensatz zu D₂O bei der Ultrazentrifugalanalyse eines Proteins nicht die Berücksichtigung des H-D-Austauschs. Schließlich sind sie problemlos in der Lage, Detergensdichten im Bereich der D₂O-Dichte (ca. 1,1 g/ml) zu kompensieren, in dem der Einsatz von D₂O aufwendig bzw. nicht mehr praktikabel ist.

Das in Gegenwart der LDAO-C₁₂E₉-Mischung gemessene partialspezifische Volumen der Cytochrom *c*-Oxidase unterscheidet sich nicht wesentlich vom unter Standardbedingungen zustande gekommenen \bar{v} -Wert. Das „Maßschneidern“ von Detergensmizellen zum Erzielen der Dichtekompensation ist damit prinzipiell für Ultrazentrifuguntersuchungen an integralen Membranproteinen einsetzbar. Insbesondere zeigt das „Testprotein“ keine signifikante Bevorzugung einer Komponente des Detergensgemisches als Bindungspartner. Dennoch empfiehlt es sich bei der Anwendung von Mischmizellen auf integrale Membran-

proteine, diesen Gesichtspunkt im Auge zu behalten, ebenso wie den Umstand, daß das für dieses Verfahren wegen seiner niedrigen Dichte notwendige LDAO für viele Proteine ein „aggressives“ Detergens ist. Der für diverse Proteine schädliche Einfluß von LDAO kann allerdings im Einzelfall durch die Kombination von LDAO mit einem „milden“ Detergens abgewehrt werden. Dies kann man am Beispiel des Protein-Pigment-Komplexes Cytochrom *c*-Oxidase studieren, der von reinem LDAO gespalten wird, während er in Gegenwart der LDAO-C₁₂E₉-Mischung offenbar intakt bleibt.

Die Methode, Dichtekompensation durch Anpassung der Detergensdichte an die Lösungsdichte zu bewerkstelligen, ist nicht neu: Die Arbeitsgruppe Rosenbusch beschrieb ein Detergens (C₈E_{4,5})³⁴ mit etwa der Dichte von Wasser [75], welches allerdings auf empfindliche Proteine denaturierend wirkt und daher nur in Einzelfällen verwendbar ist. Außerdem wird die C₈E_{4,5}-Dichte streng genommen nur von Lösungen kompensiert, deren nichtwässrige Bestandteile sehr verdünnt sind – die im Anschluß dargestellte Untersuchung des *bc*₁-Komplexes in Gegenwart von 300 mM NaCl zeigt, daß diese Voraussetzung nicht notwendig gegeben ist. Derartig enge biochemische und methodische Grenzen wie die des C₈E_{4,5}-Einsatzes kennt die neue Mischmizellenmethode nicht: Zum einen eröffnen sich biochemische Variationsmöglichkeiten durch die Wahl des mit LDAO zu mischenden Detergens³, zum anderen läßt sich jede Mizellendichte zwischen den Dichten der beiden Detergenzien über deren Mischungsverhältnis „stufenlos“ einstellen.

Vergleicht man die Mischmizellenmethode und die Densifizierungsmethoden, so stellt man erstens fest, daß sie sich bezüglich der Kosten praktisch nur in den Aufwendungen für die jeweiligen Detergenzien unterscheiden. Zweitens zeigt ein Blick auf *Tabelle 5-3*, daß die Mischmizellenmethode die einzige neue Methode ist, welche Dichtekompensation nicht mit einer Verzögerung der Gleichgewichtseinstellung erkauft.

5.5.2 Kompensation hoher Detergensdichten

Mit Saccharose und Glycerin können Detergensdichten, die die D₂O-Dichte übersteigen, kompensiert werden. Ausgesprochen wirksam als Densifizier ist Saccharose: einerseits wegen seiner besonders hohen Dichte, andererseits, weil sie wie gezeigt die effektive Dichte einer Detergensmizelle besonders deutlich senkt. Diese dichtesenkende Wirkung entfaltet Saccharose ab einer gewissen Konzentration allerdings auch am Protein. Deshalb wurde im Falle von

³⁴ C₈E_{4,5}: Octyl-Tetra-, Pentaoxyethylen (Octyl-POE)

DDM, dem gängigsten Detergens mit hoher Dichte, durch den weitgehenden Ersatz von H_2O durch D_2O die zur Dichtekompensation notwendige Saccharosekonzentration gesenkt.³⁵ Der verbleibende Fehler des Protein- \bar{v} ist im Falle der Cytochrom *c*-Oxidase mit den vorliegenden Ergebnissen bekannt und kann für unbekannte Systeme in dichtekompensierter DDM-Lösung zur \bar{v} -Korrektur herangezogen werden, sofern diese der Cytochrom *c*-Oxidase ähnlich sind (s.u.).

Der Einfluß von Saccharose in hoher Konzentration auf das Protein- \bar{v} legt nahe, Gleichgewichtsanalysen an integralen Membranproteinen nur in Gegenwart problemlos zu kompensierender Detergenzien wie C_{12}E_9 durchzuführen (ggf. muß für einen Detergenswechsel ein Präparationsprotokoll um einen Ionenaustauscher- oder Gelfiltrationsschritt ergänzt werden). Allerdings sind einige Membranproteine bekannt, die den Wechsel von DDM auf ein anderes Detergens nicht unbeschadet überstehen; der bc_1 -Komplex wird ein weiteres Beispiel liefern (s.u.). Für diese Fälle wurde hier das Verfahren zur DDM-Kompensation ausgearbeitet, als Alternative zu einschlägigen Techniken, die allesamt mit großen Nachteilen behaftet sind:

- Die Standardmethode zur direkten Bestimmung des Massenverhältnisses im Detergens-Protein-Komplex (M_D/M_P), die auf dem Einsatz von radioaktiv markiertem Detergens beruht [85], ist einerseits sehr zuverlässig (wenn auch keine Präzisionsmessung). Andererseits ist sie wegen der hohen Auslagen für radioaktiv markiertes DDM oder wegen fehlender Genehmigung für den Umgang mit offener Radioaktivität häufig nicht möglich.
- Eine „rechnerische Dichtekompensation“ durch Dichtevariation in Verbindung mit Extrapolation, wie sie z.B. in [118] durchgeführt wurde, operiert im Falle von DDM aus Gründen der Meßgenauigkeit mit D_2^{18}O , welches kommerziell zur Zeit nicht erhältlich ist. Diese Methode liefert eindeutige Ergebnisse ausschließlich für einheitliche Proteine.
- Eine direkte Kompensation der DDM-Dichte wurde bislang nur von Lustig et al. beschrieben [77], wobei Saccharose oder Nycodenz zur Erhöhung der Pufferlösungsdichte eingesetzt und die bevorzugte Bindung von Wasser an die hydrophilen Bereiche der Proteinoberfläche über eine gemittelte Hydratisierung³⁶ von Membranproteinen³⁷ abgeschätzt

³⁵ Mit der Senkung der notwendigen Saccharosekonzentration geht eine Senkung der Lösungsviskosität η einher, was die für eine Ultrazentrifugenuntersuchung nötige Zeitdauer reduziert.

³⁶ Die Hydratisierung von Proteinen in Wasser ist mit derjenigen in Gegenwart von Additiven nicht identisch, was durch Lustig et al. berücksichtigt wurde, allerdings nur in der Form, daß der Einfluß verschiedener Additive auf die Hydrathülle gemittelt wurde.

wurde. Aus dieser Schätzung in Verbindung mit einem über verschiedene (wasserlösliche) Proteine gemittelten partialspezifischen Volumen erhielten Lustig et al. ein „mittleres“ (scheinbares) Membranprotein- \bar{v} , das sie auf alle Untersuchungs- bzw. Testobjekte anwendeten. Diese wurden im übrigen als homogen angenommen, wobei diese Annahme mit wenig tauglichen Mitteln überprüft wurde. Die in dem Mittelungsverfahren steckende \bar{v} -Unsicherheit³⁸ läßt die Kompensationsmethode von Lustig et al. tatsächlich allenfalls im Falle homogener Substanzen als zuverlässig erscheinen.

Liegt ein geeignetes Testprotein zur \bar{v} -„Kalibrierung“ vor, ist für eine Ultrazentrifugenerforschung eines in DDM-Lösung vorliegenden Membranproteins die hier beschriebene Methode zuverlässig und als wesentlich genauer einzuschätzen als die Methode von Lustig et al.

Eine weitere Fehlerquelle bei Lustig et al. könnte die Benutzung einer mit Schlieren- oder Interferenzoptik ausgestatteten analytischen Ultrazentrifuge zur Bestimmung von Kompensationsdichten sein: Nach unveröffentlichten Daten von J. Flossdorf und D. Schubert sind Detergensmizellen mit druckabhängigem Verhalten interferenzoptisch nicht zuverlässig meßbar, da dieses – wie auch ein Saccharose-Konzentrationsgradient – erhebliche Auswirkungen auf den Brechungsindex zeitigt. Möglicherweise rührt daher die trotz der beschriebenen dichtesenkenden Wirkung von Saccharose erstaunlich niedrige Kompensationsdichte von DDM in [77] (die Werte bei Lustig et al. wurden bei 20°C gemessen; wie gesehen folgen die Differenzen in den Kompensationsdichten allerdings keineswegs aus dem Temperaturunterschied). Die in [81] gemessene, ebenfalls deutlich zu niedrig erscheinende DDM-Kompensationskonzentration von etwa 39% Saccharose wurde im übrigen ebenfalls via Interferenzoptik bestimmt.

Abschließend sei bemerkt, daß die zur Dichtekompensation erforderlichen Densifizierungskonzentrationen bzw. LDAO-C₁₂E₉-Mischungsverhältnisse, die in dieser Arbeit ermittelt wurden, nur für die angegebenen Bedingungen gelten. Änderungen der Temperatur oder der Pufferzusammensetzung unter sonst gleichbleibenden Umständen heben im Allgemeinen die Dichtekompensation auf. Auch ein Wechsel des Herstellers eines Detergens, selbst die Verwendung einer neuen Charge sollte eine Kontrolle der Kompensationsbedingung nach sich ziehen.

³⁷ Es wurde die Hydratisierung von wasserlöslichen Proteinen zugrundegelegt und angenommen, daß die Hydratisierung von Membranproteinen im Vergleich zu derjenigen der wasserlöslichen Proteine 50% beträgt.

³⁸ Diese Unsicherheit dürfte nach den in dieser Arbeit gemachten Erfahrungen in der Größenordnung von 0,03 ml/g liegen. Lustig et al. gingen allerdings darauf nicht näher ein.

6 Anwendung I: Der Assoziationszustand des Cytochrom *bc₁*-Komplexes von *Paracoccus denitrificans*

Der (Cytochrom) *bc₁*-Komplex von *Paracoccus denitrificans* ist als Modellsystem von Interesse: Er ist viel einfacher strukturiert als die mit 10 oder 11 Untereinheiten ausgestatteten *bc₁*-Komplexe der Mitochondrien – im Gegensatz zu diesen besteht er lediglich aus den drei funktionell obligatorischen Untereinheiten cyt *b*, cyt *c₁* und ISP (woraus sich eine Protomer-Molmasse des Komplexes von 117 kDa ergibt [67]). Andererseits scheint sich dieser „Minimalismus“ ungünstig auf seine Stabilität auszuwirken: Zumindest im solubilisierten Zustand ist es nicht selbstverständlich, daß die drei Untereinheiten des Komplexes zusammenbleiben; seine mitochondrialen Homologen sind in dieser Hinsicht weniger problematisch.

Diese Differenz in der Stabilität mag einer der Gründe dafür sein, daß von einigen mitochondrialen *bc₁*-Komplexen die Kristallstruktur vorliegt, von einem bakteriellen *bc₁*-Komplex dagegen nicht – trotz diesbezüglich erheblicher Anstrengungen. Das hat zur Folge, daß der Assoziationszustand des bakteriellen Enzyms bisher nicht geklärt ist, während derjenige des mitochondrialen aus Röntgenstrukturanalysen hervorgeht.

Angesichts der fehlenden Röntgenstruktur ist die analytische Ultrazentrifugation die Technik der Wahl, um den Assoziationszustand des bakteriellen *bc₁*-Komplexes zu charakterisieren. Dazu muß das Membranprotein solubilisiert vorliegen, woraus sich zunächst folgende Fragen ergeben:

- 1) Unter welchen Bedingungen ist das solubilierte Enzym intakt/komplett und in diesem Zustand stabil im Rahmen des Zeitbedarfs für eine Ultrazentrifugenuntersuchung?
- 2) Welche dieser Bedingungen ist für die Untersuchungsmethode am geeignetsten – vom Standpunkt der Durchführung und Auswertung des Experiments?

Die zweite Frage erwies sich als überflüssig, da nur eine Bedingung gefunden wurde, die die unter 1) geforderte Qualität gewährleistet: Der solubilierte *bc₁*-Komplex bleibt nur in Gegenwart geringer Konzentrationen von Dodecyl-Maltosid (DDM) intakt – dessen hohe Dichte die Analyse erschwert. Unter Anwendung des im vorangegangenen Kapitel entwickelten Verfahrens zur Dichtekompensation von DDM führte dennoch eine Ultrazentrifugalanalyse

des *bc₁*-Komplexes zu einem eindeutigen Ergebnis. Voraussetzung für den Erfolg der Analyse war, daß

- a) nachgewiesen werden konnte, daß der *bc₁*-Komplex – in Lösung gehalten von 0,02% (w/v) DDM – einheitlich und rein vorlag sowie stabil war, und daß
- b) mit der Cytochrom *c*-Oxidase von *Paracoccus denitrificans* ein geeignetes Testprotein zur Verfügung stand, mit dem man das neue Kompensationsverfahren „kalibrieren“ konnte.

Die Untersuchung³⁹ ergab, daß der in DDM solubilisierter Cytochrom *bc₁*-Komplex von *Paracoccus denitrificans* ein Dimer ist – wie seine mitochondrialen Verwandten, soweit bisher bekannt. Darüberhinaus wurde für das dimere *bc₁*-Komplex-DDM-Partikel ein DDM/Protein-Massenverhältnis von ca. 0,85 gefunden, was über den Vergleich mit dem Massenverhältnis anderer Membranproteine den Dimer-Befund bestätigt.

6.1 Die Präparation

Zur Gewinnung des Cytochrom *bc₁*-Komplexes in der für Analytische Ultrazentrifugation nötigen Form wurden folgende Schritte durchgeführt⁴⁰:

6.1.1 Herstellung bakterieller Membranen mit hohem Cytochrom *bc₁*-Anteil⁴¹

Um dafür zu sorgen, daß der *bc₁*-Komplex in *Paracoccus denitrificans* (Pd) überexprimiert wird, wurde in die chromosomale Deletionsmutante „MK6“ des Bakteriums (Stamm: Pd1222), dem im Unterschied zum Wildtyp das *fbc*-Operon⁴² fehlt, per Konjugation ein broad host range-Plasmid (pRI2) eingeschleust, in das das *fbc*-Operon inkloniert ist. Sowohl der Deletionsstamm als auch das Plasmid tragen Resistenzgene gegen bestimmte Antibiotika, um bei der Anzucht auf den gewünschten Stamm selektieren zu können.

Nach der Anzucht werden die Zellen in einer Manton-Gaulin-Presse aufgeschlossen. Verschiedene Zentrifugationsschritte sorgten für die Gewinnung von Plasmamembranen, die von anderen Fragmenten des Zellaufschlusses weitgehend isoliert waren. Eine Suspension der

³⁹ Eine Kurzfassung dieser Untersuchung bietet [80].

⁴⁰ Alle Schritte wurden durchgeführt von Oliver Anderka, Inst. f. Biophysikalische Chemie und Biochemie, JWG-Universität, Frankfurt am Main; s. [2] und [3].

⁴¹ Nach Marcus Korn [66], modifiziert von Oliver Anderka [2]; hier wird die Vorgehensweise nur skizziert.

⁴² *fbc*-Operon: Die drei Gene des *bc₁*-Komplexes sind in einer Operonstruktur (= Transkriptionseinheit) organisiert.

Membranen in 50 mM MES/NaOH (pH 6), 300 mM Saccharose bildet das Ausgangsmaterial für die weiteren Schritte.

6.1.2 Solubilisation⁴³

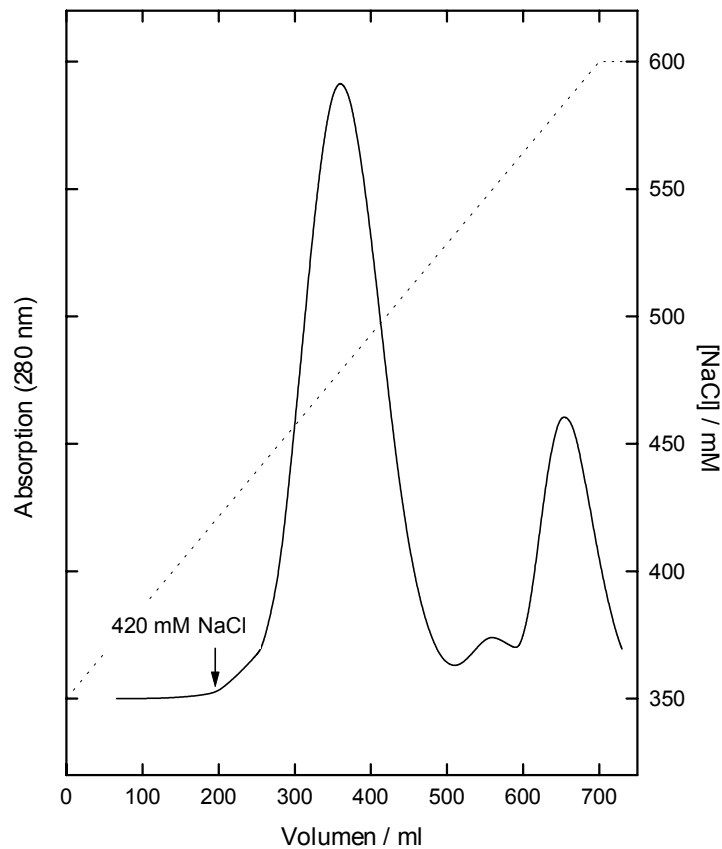
Die Membransuspension wurde bei 4°C mit 50 mM MES/NaOH (pH 6); 300 mM Saccharose auf 35 mg/ml verdünnt und mit dem Proteaseinhibitor Pefabloc SC versetzt (Endkonzentration des Inhibitors: 200 µM). Die verdünnte Membransuspension wurde tropfenweise unter Rühren mit demselben Volumen 50 mM MES/NaOH (pH 6); 300 mM Saccharose; 1,2 M NaCl; 4,2% (w/v) DDM versetzt und anschließend 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Unter dem Einfluß von damit 1,2 g DDM pro g Membranprotein wird der *bc₁*-Komplex aus der bakteriellen Plasmamembran gelöst. Das Solubilisat wurde von ungelösten Bestandteilen mittels Ultrazentrifugation getrennt (1h bei 4°C; Rotor: Beckman Ti 45 oder Beckman Ti 60; Drehzahl: 40 000 Upm) und schließlich mit 50 mM MES/NaOH (pH 6); 0,02% (w/v) DDM bis zu einer NaCl-Konzentration von 350 mM verdünnt.

6.1.3 Ionenaustauscherchromatographie⁴⁴

Um das Präparat aufzureinigen, wurde eine Anionenaustauscherchromatographie durchgeführt (Säulenmaterial: DEAE-Sepharose CL-6B, Pharmacia; Temperatur: 4°C). Es wurde eine FPLC-Anlage (Pharmacia LKB) eingesetzt. Die Säule wurde äquilibriert mit 4 Säulenvolumina (SV) 50 mM MES/NaOH (pH 6); 350 mM NaCl und 2 SV 50 mM MES/NaOH (pH 6); 350 mM NaCl; 0,02% (w/v) DDM. Pro 100 ml Säulenvolumen wurde etwa 1 g Membranprotein (bezieht sich auf alle Membranproteine) aufgetragen. Auf das Beladen der Säule folgte ein Spülgang mit 1 SV 50 mM MES/NaOH (pH 6); 350 mM NaCl; 0,02% (w/v) DDM. Der Hauptteil der Verunreinigungen konnte in diesem Schritt bereits entfernt werden. Mit einem linearen NaCl-Gradienten (50 mM MES/NaOH (pH 6); 350-600 mM NaCl; 0,02% (w/v) DDM) wurde der *bc₁*-Komplex eluiert (er beginnt ab ca. 420 mM NaCl, sich von der Säule zu lösen); das Volumen des Gradienten betrug etwa das 3,5-fache des jeweiligen Säulenvolumens. Das Elutionsprofil wurde mit einem Durchflußphotometer (Pharmacia Optical Unit UV-1) bei 280 nm gemessen und von einem x,y-Schreiber registriert.

⁴³ Nach von Jagow et al. [159], modifiziert von Oliver Anderka [3].

⁴⁴ Nach Marcus Korn [66], modifiziert von Oliver Anderka [3].



Elutionsprofil der Anionenaustauscher-Chromatographie (durchgezogene Linie); die punktierte Linie deutet den linearen NaCl-Gradienten an.

Der *bc₁*-Komplex eluiert ab etwa 420 mM NaCl; der Bereich zwischen ca. 250 und 470 ml wurde zusammengefaßt und weiterverwendet (Säulenvolumen 200 ml).

Der vorgeschaltete Spülgang bei 350 mM NaCl, bei dem der Hauptteil der Verunreinigungen eluiert, ist hier nicht gezeigt.

Abbildung 6.1

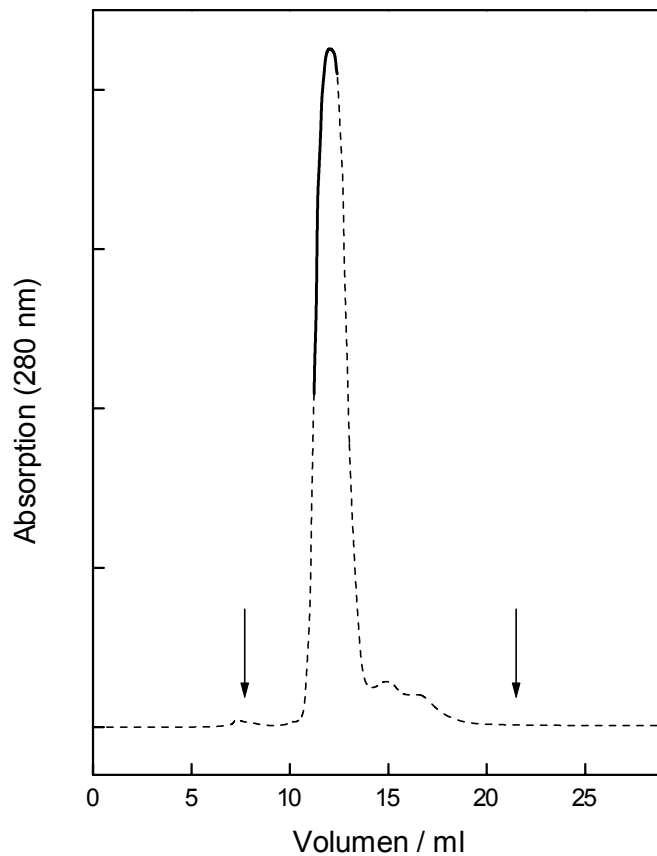
In *Abbildung 6.1* ist ein Elutionsprofil dargestellt (0,02% (w/v) DDM in allen Puffern). Redoxspektren und SDS-PAGE zufolge enthielten die Fraktionen, die den Hauptpeak bildeten (250 ml < Elutionsvolumen < 470 ml), reinen *bc₁*-Komplex (s.u.); dementsprechend wurden diese Fraktionen gesammelt.

Das gepoolte Eluat mit dem *bc₁*-Komplex wurde in Ultrafiltrationskammern (Centriprep, Fa. Amicon, Ausschlußgrenze 50 kDa; oder: Centrisart, Fa. Sartorius, Ausschlußgrenze 100 kDa) bei 4°C auf einen *bc₁*-Gehalt von ca. 100 µM ankonzentriert und dem abschließenden Reinigungsschritt zugeführt:

6.1.4 Gelfiltrationschromatographie

Um (a) den hohen Anforderungen einer Ultrazentrifugenanalyse an die Reinheit des Präparats gerecht zu werden und (b) das Protein in eine wohldefinierte – gegebenenfalls andere – Umgebung zu überführen, schloß sich eine Gelfiltrationschromatographie an (bei 4°C). Hierzu wurde dieselbe FPLC-Anlage einschließlich Durchflußphotometer und Schreiber benutzt wie bei der Ionenaustauscherchromatographie. Die Säule (24 ml Superose 6 HR 10/30, Pharmacia) wurde mit dem Puffer äquilibriert, in dem die Ultrazentrifugenuntersuchung durchgeführt werden sollte. 20 – 200 µl Probe wurden mit einer Hamilton-Spritze aufgetragen; bei einer Flußrate von etwa 12 ml/h wurde das Protein eluiert (Elutionspuffer = Äquilibrierpuffer). Das Elutionsprofil wurde bei 280 nm aufgenommen.

Zu (a): Das Resultat der Ionenaustauscherchromatographie ist ein Präparat, dessen Proteininhalt im SDS-PA-Elektrophorese-Gel (Coomassie-Färbung) sowie im Redox-Spektrum als reiner *bc₁*-Komplex erscheint. Damit sind allerdings einige Prozent an Verunreinigung nicht ausgeschlossen. Bei den Verunreinigungen, die durch Gelfiltration minimiert werden sollen, handelt es sich jedoch nur zum Teil um fremde Proteine. Der andere Teil, möglicherweise der Hauptteil, stammt vom *bc₁*-Komplex selbst: Er kann unter „strapaziösen“ Bedingungen, wie sie z.B. die Bindung am Anionenaustauscher darstellt, einerseits Untereinheiten verlieren, andererseits unspezifische Aggregate bilden (die auch aus Zerfallsprodukten bestehen können). Daraus ergibt sich eine heterogene Mischung aus komplettem *bc₁*-Komplex, seinen verschiedenen Zerfallsprodukten und aggregiertem Material. Das Ausmaß der Heterogenität ist allerdings unter günstigen Bedingungen minimal, wie man z.B. dem Elutionsprofil der Gelfiltration aus *Abbildung 6.2* entnehmen kann: Die durchgezogene Linie markiert den Bereich, der für die anschließenden Ultrazentrifugenexperimente vorgesehen war, da er praktisch ausschließlich den kompletten, intakten *bc₁*-Komplex enthielt; zu niedrigeren Elutionsvolumina hin sieht man eine winzige Menge vermutlich aggregierten Materials, rechts vom Hauptpeak eine geringe, aber signifikante Menge kleinerer Bestandteile – wohl vorwiegend Zerfallsprodukte des *bc₁*-Komplexes (s.u.). Wie im folgenden Kapitel gezeigt wird, ist dieses hohe Maß an Homogenität allerdings keine Selbstverständlichkeit: Die Homogenität steht und fällt insbesondere mit der Art und Konzentration des Detergens. Doch selbst unter günstigen Bedingungen sank die Qualität des Präparats innerhalb weniger Tage meßbar, weswegen die Ultrazentrifugenexperimente so zügig wie möglich nach der Gelfiltration stattfinden mußten.



Elutionsprofil der Gelfiltrations-Chromatographie (150 μ l 9,6 mg *bc₁*-Komplex pro ml in Gegenwart von DDM). Die durchgezogene Linie markiert den Bereich, der für die Ultrazentrifugen-Untersuchung zusammengefaßt wurde (dieser Pool enthielt ca. 0,64 mg *bc₁*-Komplex pro ml). Säulenpuffer: 50 mM MES/NaOH (pH 6,0); 300 mM NaCl; 0,02% (w/v) DDM. Die Absorptionsachse ist nicht kalibriert. Die Pfeile deuten das Ausschlußvolumen („void volume“) bzw. das Gesamt-Flüssigkeitsvolumen („included volume“) an⁴⁵.

Abbildung 6.2

Zu (b): Die Gelfiltrationschromatographie ist nicht nur ein Verfahren zur Aufreinigung des Präparats; sie bietet darüberhinaus die Möglichkeit, die Zusammensetzung der Lösung, in der das Protein vorliegt, wohldefiniert zu ändern. Im vorliegenden Fall wird diese Möglichkeit genutzt, um die Ionenstärke zu senken, genauer: den NaCl-Gehalt des Ionenaustauscher-Eluats von ca. 480 mM auf genau 300 mM einzustellen, und um gegebenenfalls das Detergens zu tauschen bzw. die Detergenskonzentration zu ändern. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß man bei der Ultrafiltration Gefahr läuft, nicht nur das Protein anzukonzentrieren, sondern auch das Detergens. Im Falle von DDM geschieht das

⁴⁵ Die beiden Größen wurden über Blue Dextran- bzw. NaCl-Chromatogramme ermittelt.

unweigerlich, selbst unter Verwendung von Filtern mit der für das vorliegende Problem größtmöglichen Ausschlußgrenze von 100 kDa (die einschlägigen Daten sind der *Abbildung* 6.3 zu entnehmen). Diese Erkenntnis ist insofern wichtig, als sich gezeigt hat, daß der *bc₁*-Komplex nur bei niedrigen DDM-Konzentrationen – im Bereich von 0,02% – mehrere Tage stabil ist. Es gilt also, nach der Ultrafiltration rasch mithilfe der Gelfiltration die Detergentskonzentration auf den gewünschten Wert zu senken.

Vorläufig ergibt sich für die Zusammensetzung der Probe, die in der Ultrazentrifuge analysiert wird:

50 mM MES/NaOH (pH 6);

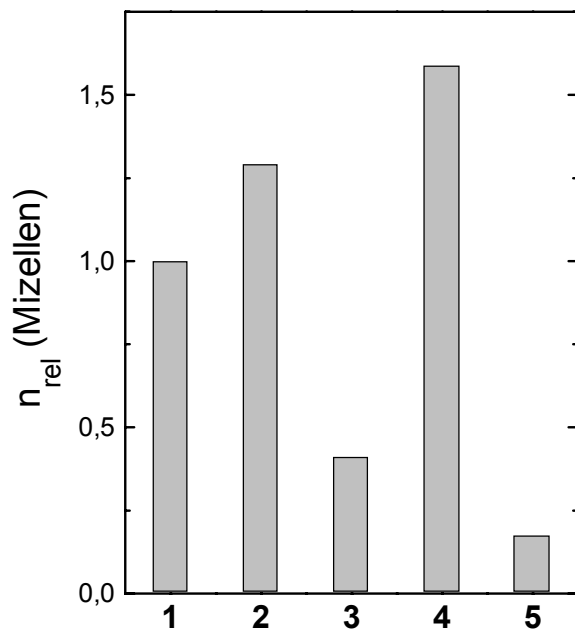
300 mM NaCl;

DDM: 0,02% (w/v), oder

C₁₂E₉: Konzentration zwischen 0,005 und 0,1% (w/v), oder

C₁₂E₉-LDAO-Mix (60:40 (w/w)): Gesamt-Detergentskonzentration 0,1% (w/v));

Proteinkonzentration: maximal 0,7 mg/ml.



Nachweis der Ankonzentrierung von DDM durch Ultrafiltration⁴⁶:

0,2% (w/v) DDM wurde mittels Ultrafiltration (100 kDa- bzw. 50 kDa-Filter) auf das $(0,6 \pm 0,1)$ -fache Ausgangsvolumen reduziert. Die 0,2%-Ausgangslösung (**1**), das „Konzentrat“ des 100 kDa-Filters (**2**), das dazugehörige Filtrat (**3**), sowie „Konzentrat“ und Filtrat des 50 kDa-Filters (**4** und **5**) wurden mit dynamischer Lichtstreuung⁴⁷ untersucht. Gemessen wurde die Zahl der DDM-Mizellen in einem gegebenen Volumen⁴⁸. Graphisch aufgetragen ist die auf die Mizellenzahl der Ausgangslösung (**1**) bezogene Mizellenzahl (n_{rel}) der jeweiligen Lösung (**1-5**).⁴⁹

Abbildung 6.3

⁴⁶ Durchgeführt von Oliver Anderka. Ultrafiltrationskammern: Centrisart, Fa. Sartorius (Ausschlußgrenze 100 kDa); Centriprep, Fa. Amicon (Ausschlußgrenze 50 kDa).

⁴⁷ Durchgeführt von Dr. Host Ruf, MPI für Biophysik, Frankfurt am Main. Meßgerät: Standard-Lichtstreuapparat (ALV Langen, Deutschland).

⁴⁸ Als „Nebenprodukt“ der Lichtstreuung erhielt man den mittleren Durchmesser der Mizellen: Lösung **1**: 7,4 nm; Lösung **2** und Lösung **4**: 7,5 nm; die Messung der Mizellengröße in den Lösungen **3** und **5** wurde durch die Gegenwart von Verunreinigungen mit im Vergleich zur Mizelle großem Durchmesser verhindert.

⁴⁹ Die Ankonzentrierung von DDM durch Ultrafiltration wurde in einem ähnlichen Experiment bestätigt: Die Ausgangslösung enthielt DPH-markiertes DDM (0,2% (w/v); 0,5 mg DPH pro g DDM). Durch Ultrafiltration wurden Lösungen hergestellt, die den Lösungen **2-5** entsprachen. Bei 357 nm konnte im Photometer die Absorption von DPH gemessen und daraus die Mizellenkonzentration bestimmt werden. Das Ergebnis deckte sich mit dem Befund aus der dynamischen Lichtstreuung.

6.2 Methoden zur Qualitätskontrolle des Präparats⁵⁰

Das fertige Präparat ist daraufhin zu überprüfen, ob sein Proteininhalt nahezu vollständig aus bezüglich seiner Untereinheiten komplettem *bc₁*-Komplex besteht, ob der Zusammenhalt der Untereinheiten ausreichend zeitbeständig ist und ob der Komplex seine biologische Funktion auszuüben in der Lage ist. Hierfür kamen folgende Techniken zum Einsatz:

6.2.1 Gelfiltrationschromatographie

Über die beiden im vorangegangenen Kapitel genannten – präparativen – Leistungen der Gelfiltration hinaus gibt einen weiteren Grund, diese Technik einzusetzen, besonders wenn eine FPLC-Anlage für eine hohe Auflösung sorgt: Sie kann zur Kontrolle der Qualität und Stabilität eines Präparats herangezogen werden. Für eine ausschließlich zu diesem analytischen Zweck durchgeführte Chromatographie benötigt man deutlich weniger Protein als für eine präparative; darüberhinaus gibt es keinen Unterschied.

6.2.2 SDS-PA-Gelelektrophorese

Zur Charakterisierung der im Präparat vorliegenden Untereinheiten des *bc₁*-Komplexes sowie zur Detektion von Verunreinigungen wurde SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Coomassie-Färbung durchgeführt [68] [108].

6.2.3 Redox-Spektren

Zur Identifizierung des *bc₁*-Komplexes über seine Häm-Gruppen wurde das Differenzspektrum des reduzierten und des oxidierten Präparats gemessen (nach [66]). Hierzu wurde das Absorptionsspektrum des solubilisierten Enzyms zunächst im oxidierten, dann im reduzierten Zustand jeweils im Wellenlängenbereich zwischen 500 und 650 nm in einem Zweistrahlphotometer aufgenommen. Für die Messung des oxidierten Zustands ist die Zugabe eines Oxidationsmittels (z.B. Kaliumhexacyanoferrat (III)) nicht erforderlich, da das Ausgangsmaterial nahezu vollständig oxidiert vorliegt. Um die Hämgruppen vollständig in die reduzierte Form zu überführen, wird die Probe mit einer geringen Menge frischen Natriumdithionits versetzt. Das Spektrum des oxidierten, subtrahiert vom Spektrum des reduzierten Zustands ergibt das Differenzspektrum.

⁵⁰ Gelfiltrationschromatographie, SDS-PAGE, Redox-Spektrophotometrie und Aktivitätsmessungen wurden durchgeführt von Oliver Anderka.

Über die Identifizierung des Proteins hinaus läßt sich aus dem Differenzspektrum der Hämgehalt bestimmen und daraus die Konzentration des *bc₁*-Komplexes [66].

6.2.4 Aktivitätsmessungen⁵¹

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität des *bc₁*-Komplexes wurden zum solubilisierten Protein das künstliche Substrat Decylubihydrochinon sowie Cytochrom *c* (aus Pferdeherz) zugegeben und der Zeitverlauf der Cytochrom *c*-Reduktion bei 550 nm im Zweistrahlphotometer gemessen. Daraus ergibt sich ein direktes Maß für die Enzymaktivität. Zum Vergleich wurde die Aktivität auch für die Membran, also für den *bc₁*-Komplex *in situ* bestimmt. Das Verhältnis der Aktivität des solubilisierten Enzyms zu derjenigen der Membran gibt Auskunft über den Zustand des solubilisierten Proteins, d.h. darüber, wie weit es nativ bzw. bezüglich seiner Untereinheiten vollständig ist.

6.2.5 Analytische Ultrazentrifugation

Die letzte Überprüfung der Qualität des Präparats erfolgt durch die Analytische Ultrazentrifugation selbst. Sowohl aus Sedimentationsgleichgewichts- als auch aus Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen lassen sich Schlüsse auf Homogenität, Reinheit und Stabilität des Präparats ziehen:

Gleichgewichtsläufe geben einen Hinweis auf die Homogenität und Reinheit einer Probe. Kriterium ist die Qualität der mit einer einzigen sedimentierenden Komponente durchgeführten Anpassung eines gemessenen Gleichgewichtsprofils.

Mit den modernen Auswerteverfahren für Geschwindigkeitsläufe, *c(s)*-Analyse und van Holde-Weischet-Analyse, ist diese Technik besonders geeignet, Verunreinigungen bzw. Abweichungen von der Einheitlichkeit der Substanz zu detektieren.

Der Vergleich von zu verschiedenen Zeiten durchgeführten Geschwindigkeitsläufen gibt Auskunft über die Stabilität des Präparats. Da verglichen mit Gleichgewichtsläufen Geschwindigkeitsläufe wenig Zeit benötigen, können sie z.B. vor und nach einem Gleichgewichtsexperiment durchgeführt werden.

⁵¹ Nach Schröter et al. [112], modifiziert von Oliver Anderka [3].

6.3 Auswirkung verschiedener Detergentien auf das Präparat

Da das zur Solubilisierung verwendete sehr milde Detergens DDM wegen seiner hohen Dichte für Ultrazentrifugen-Analysen nicht optimal ist, wurden verschiedene weitere Möglichkeiten für die Detergens-Umgebung des Proteins in Betracht gezogen.

Die Suche nach den Detergenzien, die das Protein in seinem nativen Zustand belassen **und** der Analyse keine Probleme bereiten, erbrachte folgende Resultate:

6.3.1 C₁₂E₉

Da C₁₂E₉ ein relativ mildes Detergens ist, dessen Dichte bequem kompensiert werden kann, wurde der solubilisierter *bc₁*-Komplex auf 0,1% (w/v) C₁₂E₉ umgestellt. Diese Umstellung wurde in einem ersten Experiment während des Ionenaustauscherschrittes vorgenommen. Das Eluat dieser Ionenaustauscherchromatographie wurde wie beschrieben einkonzentriert, jedoch anschließend nicht einer Gelfiltration unterzogen, sondern auf 50 mM MES/NaOH (pH 6); ca. 300 mM NaCl; 0,1% (w/v) C₁₂E₉; 5,5% (w/v) Saccharose eingestellt und bei 4°C in der Ultrazentrifuge analysiert (5,5% (w/v) Saccharose war nötig, um die C₁₂E₉-Dichte zu kompensieren). Es stellte sich heraus, daß die Stabilität des Komplexes unter der neuen Bedingung erheblich litt – die Gleichgewichtsprofile der Ultrazentrifugenuntersuchung ließen sich nur unter der Annahme einer erheblichen Heterogenität des Präparats anpassen, wobei der überwiegende Teil der sedimentierenden Partikel eine Molmasse von << 100 kDa hatte (Molmasse des monomeren *bc₁*-Komplexes: 117 kDa).

Daraufhin wurde, um die Präparation schonender zu gestalten, die Gelfiltration in das Reinigungsprotokoll aufgenommen und der Detergenswechsel in diesem Schritt vollzogen. Dadurch fand die für das Protein strapaziöse Bindung an das Ionenaustauschermaterial unter als schonend bekannten Bedingungen statt. In einer Reihe von Experimenten wurde zudem die C₁₂E₉-Konzentration sukzessive gesenkt, da das Detergens offenbar das Aufbrechen des Komplexes verursacht. Das Ergebnis der Untersuchung von aufgereinigtem *bc₁*-Komplex in 50 mM MES/NaOH (pH 6); 300 mM NaCl; 0,005-0,1% (w/v) C₁₂E₉:

Eine C₁₂E₉-Konzentration von zwischen 0,1 und 0,01% verursachte den gründlichen Zerfall des *bc₁*-Komplexes. Innerhalb von 24 Stunden – dem Mindestzeitbedarf für einen Gleichgewichtslauf – war das Präparat komplett verändert, wie sich durch Gelfiltrationsanalyse herausstellte. Als Beispiel ist in *Abbildung* 6.4 das Gelfiltrationsprofil des Wechsels von 0,02% (w/v) DDM auf 0,01% (w/v) C₁₂E₉ zu sehen (gestrichelte Linie). Die vordere Flanke des Hauptpeaks wurde gesammelt und nach eintägiger Lagerung bei 4°C erneut in 0,01%

C₁₂E₉ chromatographiert (Abbildung 6.4, punktierte Linie). Die hier zu sehende Veränderung des Präparats korrelierte mit einem Aktivitätsverlust des Enzyms.

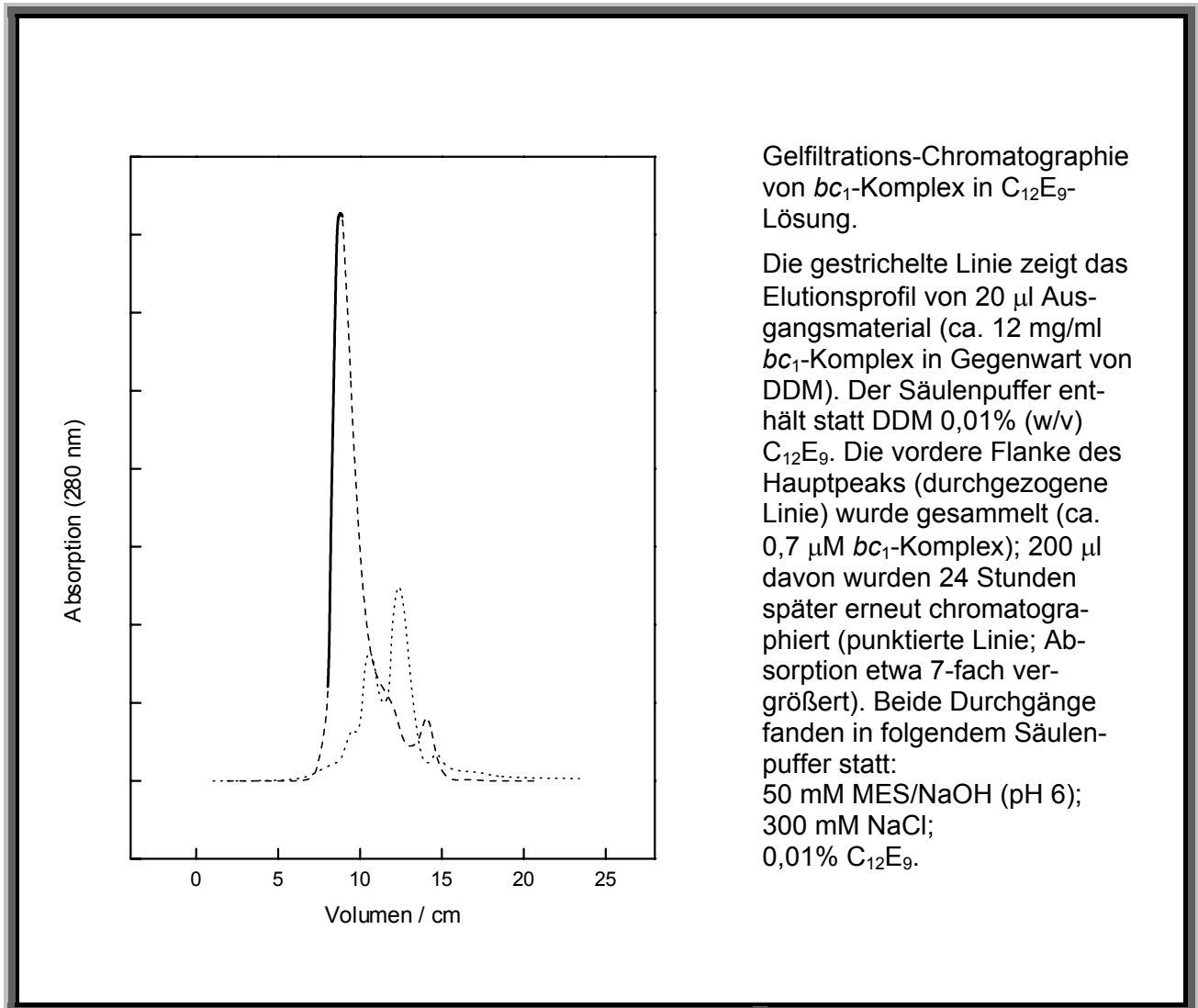
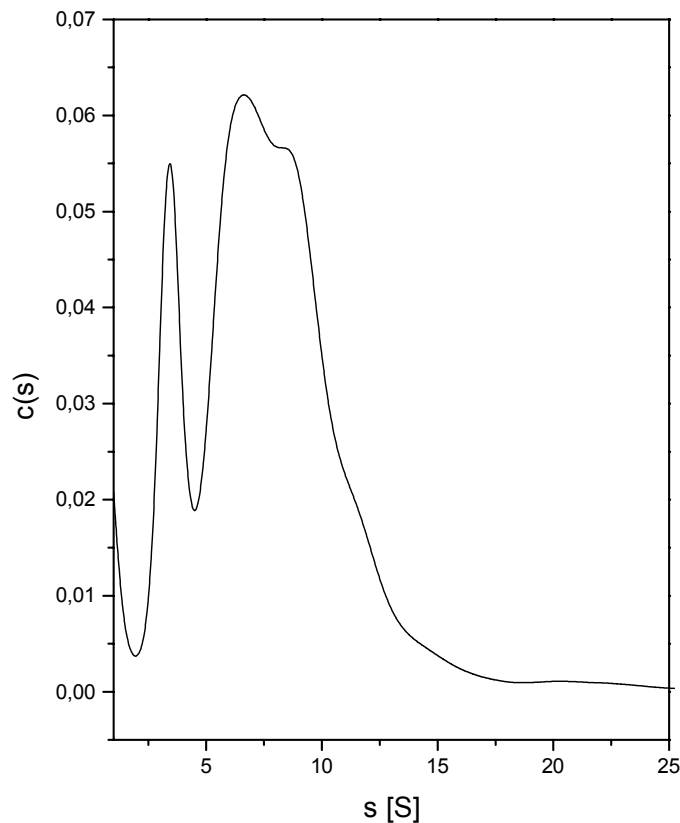


Abbildung 6.4

Bei einer Konzentration von 0,005% (w/v) C₁₂E₉ dagegen ergab sich ein andersartiges, aber ebenfalls unerwünschtes Bild: Das Protein eluierte zum größten Teil im Ausschlußpeak der Säule und war somit massiv aggregiert. Ein detaillierteres Bild erhält man durch Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse (Abbildung 6.5; der Puffer enthielt zusätzlich 5,5% (w/v) Saccharose; daß es sich hierbei um weitgehend aggregiertes Material handelt, bestätigte ein Gleichgewichtslauf).



s-Wert Verteilung (optimale Anpassung) des bc_1 -Komplexes in: 50 mM MES/NaOH (pH 6); 300 mM NaCl; 0,005% (w/v) $C_{12}E_9$; 5,5% (w/v) Saccharose. Experimentelle Bedingungen: Rotorgeschwindigkeit 40000 Upm; Rotortemperatur 4°C; Meßwellenlänge 412 nm.

Abbildung 6.5

6.3.2 Mischung aus $C_{12}E_9$ und LDAO

Die Möglichkeit, die Dichte eines Detergens dadurch zu kompensieren, daß man es mit einem Detergens sehr geringer Dichte mischt, sollte zur Analyse der bc_1 -Komplex-Quartärstruktur genutzt werden. Es zeigte sich allerdings in ersten Ultrazentrifugenexperimenten, daß die Gegenwart von LDAO den bc_1 -Komplex noch gründlicher zerlegt, als dies in $C_{12}E_9$ -Lösungen ohnehin schon der Fall ist.⁵² Demzufolge wurde dieser Ansatz verworfen.

⁵² Die Konzentration von LDAO bzw. $C_{12}E_9$ lag in allen Fällen, in denen mit der Detergensemischung experimentiert wurde, deutlich über der jeweiligen kritischen Mizellenkonzentration.

6.3.3 DDM

Während gemäß Gelfiltrationsanalysen ab einer DDM-Konzentration von etwa 0,1% (w/v) die Stabilität des *bc₁*-Komplexes nicht ausreichend war, zeigte dasselbe Verfahren ein hinsichtlich der Quartärstruktur weitgehend stabiles Enzym – kaum Aggregation, kaum Zerfall –, wenn seine Aufreinigung und anschließende Untersuchung bei weit niedrigeren DDM-Konzentrationen – die andererseits noch deutlich über der kritischen Mizellenkonzentration lagen – durchgeführt wurde.

Im folgenden wird erstens der Nachweis erbracht, daß der *bc₁*-Komplex in Gegenwart von **0,02% (w/v) DDM** (bei 4°C) in dem Zustand vorliegt, dessen Untersuchung vorgesehen war, zweitens wird gezeigt, daß diese Untersuchung mit den gegebenen Mitteln Aussicht auf Erfolg hat.

6.4 *Nativität, Stabilität, Reinheit und Einheitlichkeit des bc₁-Komplexes in 0,02% DDM*

Wie in Kap. 6.1.3 angemerkt, beinhaltet der Pool der dort beschriebenen Ionenaustauscherchromatographie fast ausschließlich die Untereinheiten des *bc₁*-Komplexes, wie dem Redoxspektrum (Daten nicht gezeigt) und der SDS-PAGE (s. *Abbildung 6.6*) des Pools zu entnehmen ist.

Der nach dem abschließenden Gelfiltrationsschritt in

50 mM MES/NaOH (pH 6); 300 mM NaCl; 0,02% (w/v) DDM

vorliegende *bc₁*-Komplex wird im folgenden daraufhin überprüft, ob er intakt/ funktionsfähig ist und seinen Zustand innerhalb der für Gleichgewichtsanalysen nötigen Zeit beibehält, ob er in für Ultrazentrifugenuntersuchungen ausreichend hoher Reinheit vorliegt, und ob er aus nur einer sedimentierenden Komponente besteht. Für einen nachweislich intakten, stabilen, reinen und einheitlichen *bc₁*-Komplex wäre die Frage nach seinem Oligomer-Verhalten zum Teil bereits beantwortet und die Frage nach seiner Stöchiometrie lösbar.

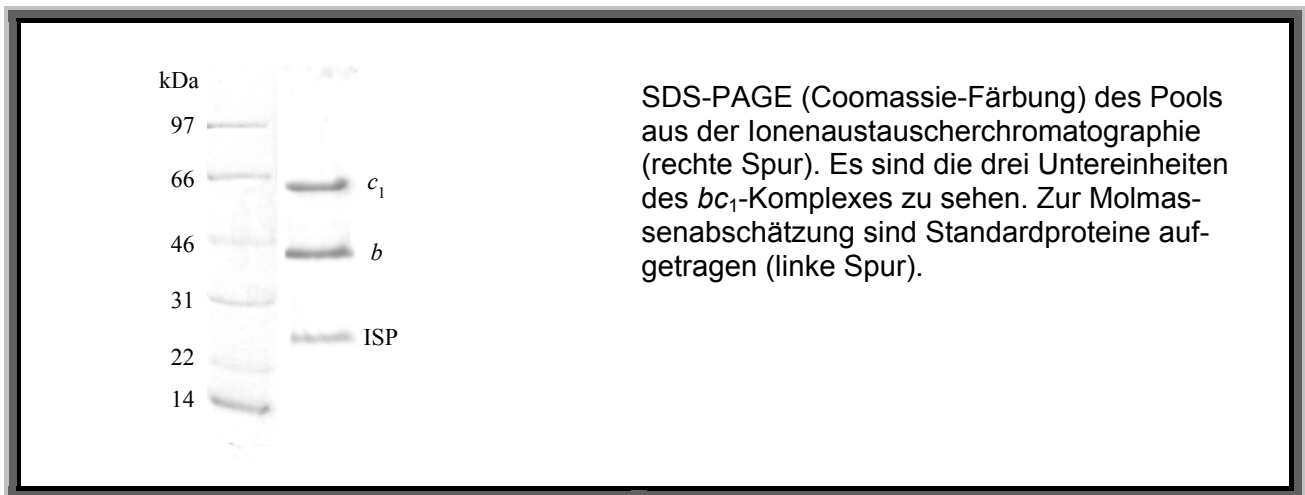
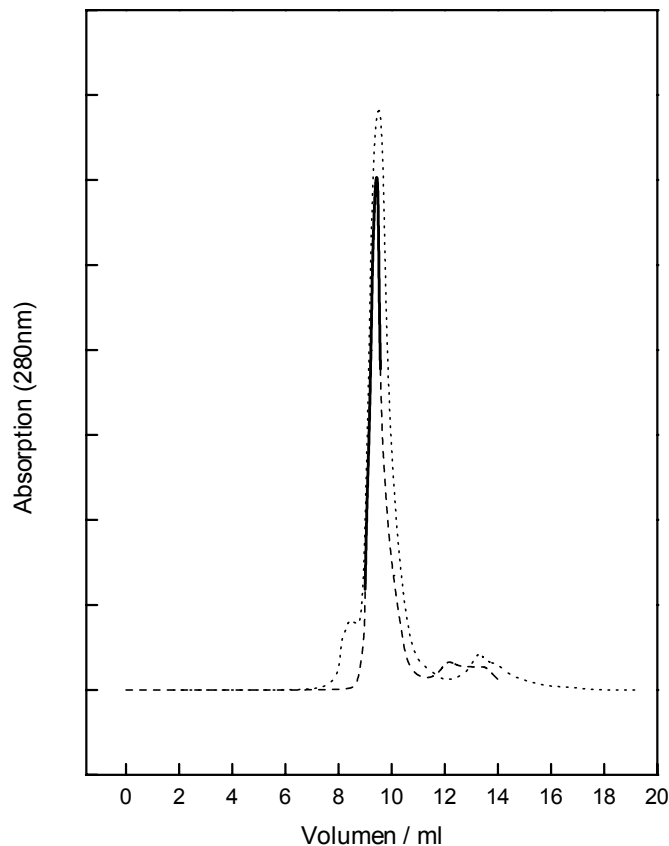


Abbildung 6.6

Zum Nachweis des **nativen** Zustands des fertig aufgereinigten bc_1 -Komplexes wurde er auf seine Funktionsfähigkeit, d.h. auf seine spezifische enzymatische Aktivität hin überprüft: Diese lag bei ca. 85% der Membranaktivität, was zeigt, daß das solubilisierte Enzym weitgehend nativ und – da für die Funktion alle Untereinheiten notwendig sind – komplett war. Wie Aktivitätsmessungen nach mehrtägiger Lagerung des Präparats bei 4°C zeigten, änderte/verschlechterte sich dieser Zustand des bc_1 -Komplexes in einem für die geplanten Untersuchungen nötigen Zeitraum nicht bzw. kaum.

Zur weiteren, genaueren Überprüfung der **Stabilität** wurde das aus dem Ionenaustauschschritt resultierende Präparat Gel-filtriert, der Peak gesammelt, bei 4°C aufbewahrt und 24h später erneut chromatographiert. Die Elutionsprofile der beiden Durchgänge sind zu sehen in *Abbildung 6.7*. Der Vergleich mit den entsprechenden Profilen des $C_{12}E_9$ -Experiments aus *Abbildung 6.4* zeigt den entscheidenden Unterschied: Das DDM-Präparat ist weitgehend stabil. Allerdings hat sich nach einem Tag offenbar eine geringe Menge einer größeren Komponente gebildet.



Gelfiltrations-Chromatographie von *bc₁*-Komplex in Gegenwart von 0,02% DDM.

Die gestrichelte Linie zeigt das Elutionsprofil von 20 μ l Ausgangsmaterial (ca. 11,7 mg/ml *bc₁*-Komplex in DDM-Lösung). Das Zentrum des Hauptpeaks (durchgezogene Linie) wurde gesammelt (ca. 1,7 μ M *bc₁*-Komplex); 200 μ l davon wurden 24 Stunden später erneut chromatographiert (punktierte Linie; Absorption etwa 10-fach vergrößert). Säulenpuffer: 50 mM MES/NaOH (pH 6,0); 300 mM NaCl; 0,02% (w/v) DDM. Temperatur (Gelfiltration und Lagerung): 4°C.

Abbildung 6.7

Schließlich wurde mit zu verschiedenen Zeiten durchgeführten Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten nachgewiesen, daß das Enzym über Tage hinweg bei 4°C stabil war. Der Nachweis ist dargestellt in *Abbildung 6.8*: *Abbildung 6.8A* zeigt die *s*-Wert-Verteilungen eines Präparats mit 0,34 mg/ml *bc₁*-Komplex 4 h bzw. 47 h nach Ende der Präparation. Sie korrelieren mit den Resultaten der Gelfiltrationsanalyse insofern, als beide Verteilungen nahezu identisch sind. In *Abbildung 6.8B* sind zwei nach van Holde-Weischet analysierte Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente mit *bc₁*-Komplex zu sehen, wobei in einen Fall ein frisches Präparat, im anderen ein mehrere Tage altes untersucht wurde; die beiden Resultate sind identisch. Der *bc₁*-Komplex in 0,02% DDM ist demnach selbst für eine Langzeitanalyse in der Ultrazentrifuge ausreichend stabil.

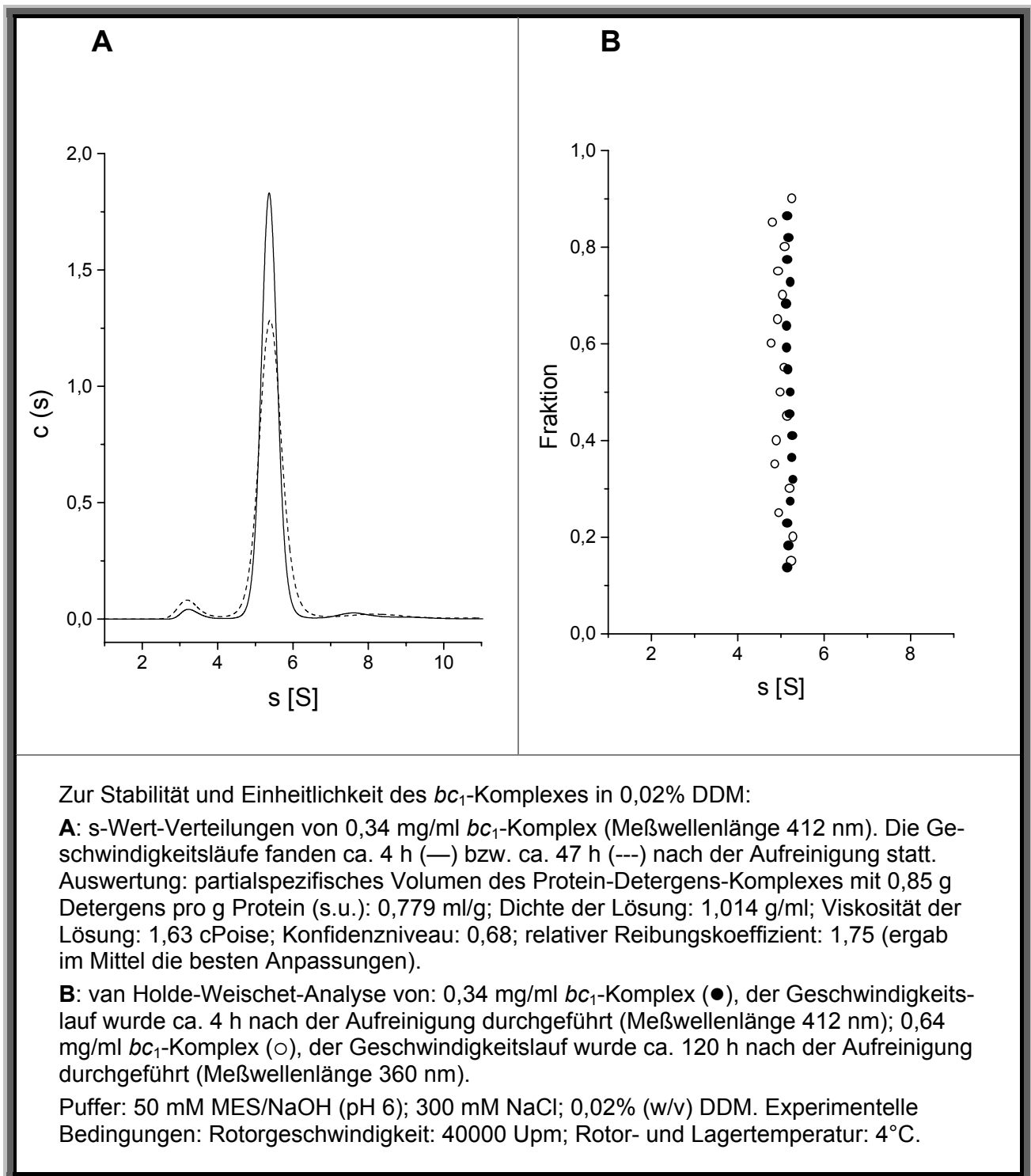
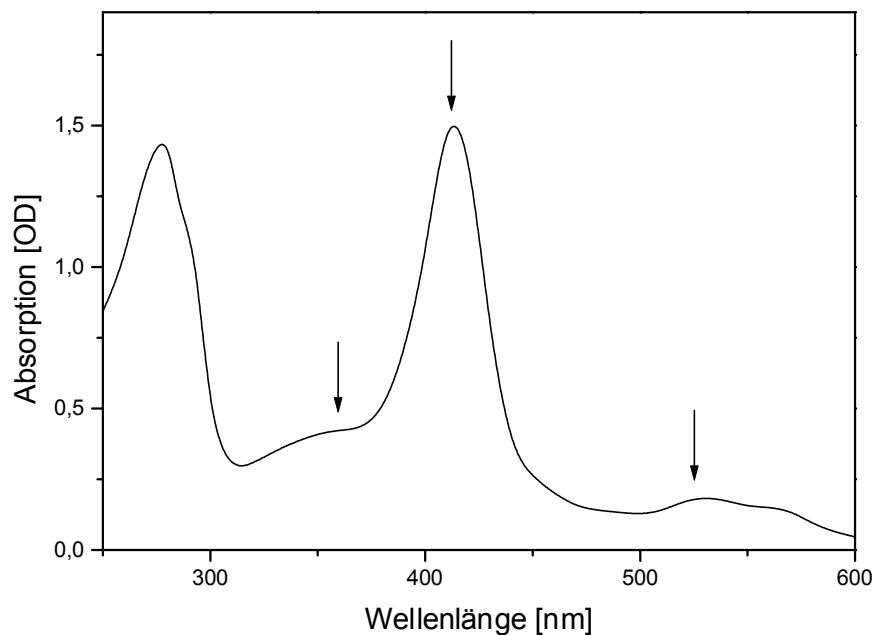


Abbildung 6.8



Absorptionsspektrum des *bc₁*-Komplexes in 50 mM MES/NaOH (pH 6); 300 mM NaCl; 0,02% (w/v) DDM (aufgenommen bei Raumtemperatur gegen den Puffer). Meßgerät: Hitachi U-2000; Schichtdicke: 1 cm.

Die Pfeile markieren die für die Messungen in der Ultrazentrifuge gewählten Wellenlängen: 360 nm, 412 nm (Soret-Bande) und 525 nm.

Abbildung 6.9

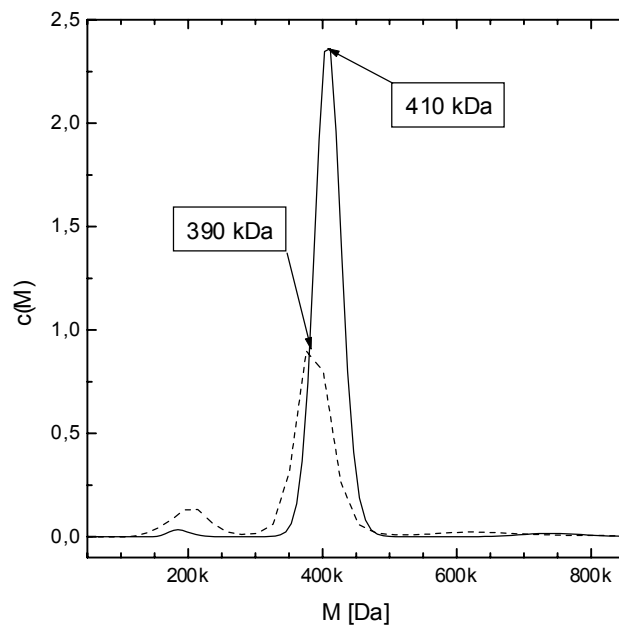
Auch bezüglich der **Reinheit** des Präparats korrelieren die Elutionsprofile der Gelfiltration (*Abbildung 6.2* und *Abbildung 6.7*) mit den s-Wert-Verteilungen (*Abbildung 6.8A* und *Abbildung 6.12*): Beide Methoden zeigen neben dem Hauptbestandteil, dem *bc₁*-Komplex (vgl. Redox-Spektren und SDS-PAGE), der als eine einzige Komponente erscheint, in geringem Ausmaß jeweils eine kleinere und eine größere Komponente, deren Charakter nicht sicher geklärt ist. Während allerdings die beiden mutmaßlichen Verunreinigungen im Elutionsprofil bis zu jeweils 10% der Gesamtabsorption erreichen können, ist und bleibt ihr Anteil in den c(s)-Verteilungen im Allgemeinen deutlich niedriger. Der Grund hierfür ist der Umstand, daß die Elutionsprofile der Gelfiltration bei einer Wellenlänge von 280 nm, bei der auch nicht-hämhaltige Proteine/ Proteinbestandteile sichtbar sind, gemessen wurden, während in Ultrazentrifuganalysen die Absorption der Häm-Gruppen bzw. des Eisen-Schwefel-Clusters genutzt wurde (Meßwellenlängen: 360 nm bzw. 525 nm für hohe Protein-

konzentrationen, ansonsten 412 nm; s. *Abbildung 6.9*). Damit war das für Ultrazentrifuguntersuchungen nötige Maß an Reinheit (ca. 95% Anteil des Untersuchungsobjekts an der Gesamtabsorption der sedimentierenden Partikel) gewährleistet.

Möglicherweise ebenfalls auf die verschiedenen Meßwellenlängen zurückzuführen ist die Beobachtung, daß gemäß Gelfiltration die Konzentration der größeren Komponente sichtbar zunimmt, was aus der *c(s)*-Analyse nicht hervorgeht, die ihrerseits eine Zunahme der kleineren Komponente betont (s. *Abbildung 6.7* bzw. *Abbildung 6.8A*).

Die – in geringem Maße stattfindende – Konzentrationserhöhung der kleineren Komponente deutet darauf hin, daß es sich hierbei um ein Degradationsprodukt handelt (die größere Komponente könnte nicht gezeigten Daten zufolge ein Aggregationsprodukt freier Untereinheiten des Komplexes sein). In manchen Präparaten schien zudem der Komplex im Laufe der Zeit um das Rieske-Protein verkleinert worden zu sein (die Sedimentationsgleichgewichtsdaten dieser Präparate wurden verworfen). Die Molmassen-Verteilung⁵³ eines derartigen Präparats, deren Rohdaten zur Verdeutlichung des (partiellen) Zerfalls nach besonders langer Lagerung (nahezu 8 Tage bei 4°C) aufgenommen wurden, ist als gestrichelte Linie in *Abbildung 6.10* dargestellt; zum Vergleich ist die Molmassenverteilung eines frischen Präparats gezeigt. Es ist zu beachten, daß proteingebundenes Dodecylmaltosid in die Molmasse(n) eingeht; es werden 0,85 g Detergens pro g Protein angenommen (s.u.). Der Zerfall äußert sich als Bildung von ca. 14% (bezogen auf die Gesamtabsorption bei 360 nm) eines Bestandteils mit etwa der halben Hauptkomponenten-Molmasse. Letztere verschiebt sich gleichzeitig geringfügig zu niedrigeren Werten (s.u.).

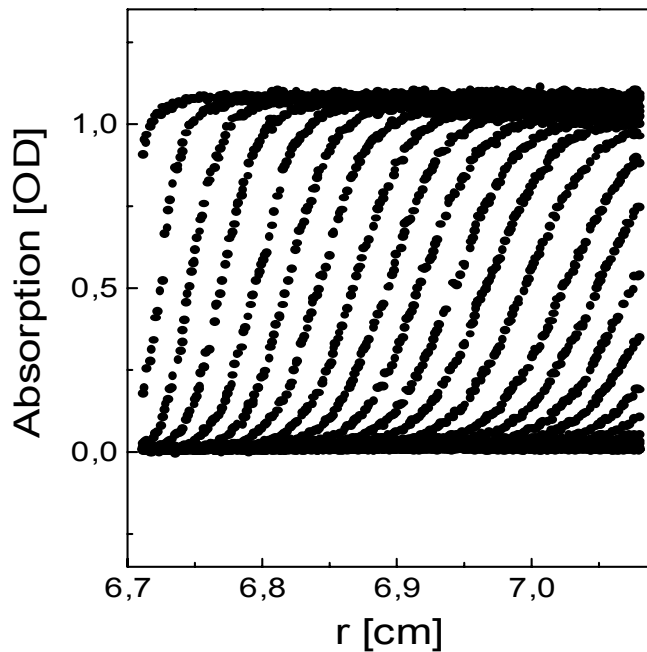
⁵³ SEDFIT bietet die direkte Umrechnung einer *c(s)*-Verteilung in eine Molmassenverteilung, *c(M)*, auf Basis der gesetzten Parameter an.



Molmassen-Verteilungen basierend auf Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen mit 1) 0,34 mg/ml *bc₁*-Komplex (durchgezogene Linie, gemessen 4 h nach Aufreinigung bei 412 nm) und 2) 0,68 mg/ml *bc₁*-Komplex (gestrichelte Linie, gemessen 190 h nach Aufreinigung bei 360 nm). Puffer, experimentelle Bedingungen und Parameter der Auswertung: siehe *Abbildung 6.8*

Verteilung 1) wird einem intakten *bc₁*-Komplex zugeordnet, Verteilung 2) einem partiell zerfallenen.

Abbildung 6.10



Sedimentationsverlauf (vgl. Kap. 3.5.1) von 0,34 mg/ml *bc₁*-Komplex, aufgenommen ca. 4 h nach Ende der Präparation (Meßwellenlänge 412 nm). Die dazugehörige *c(s)*-Verteilung ist in *Abbildung 6.12* zu sehen (-----).

Puffer und experimentelle Bedingungen siehe *Abbildung 6.8*

Abbildung 6.11

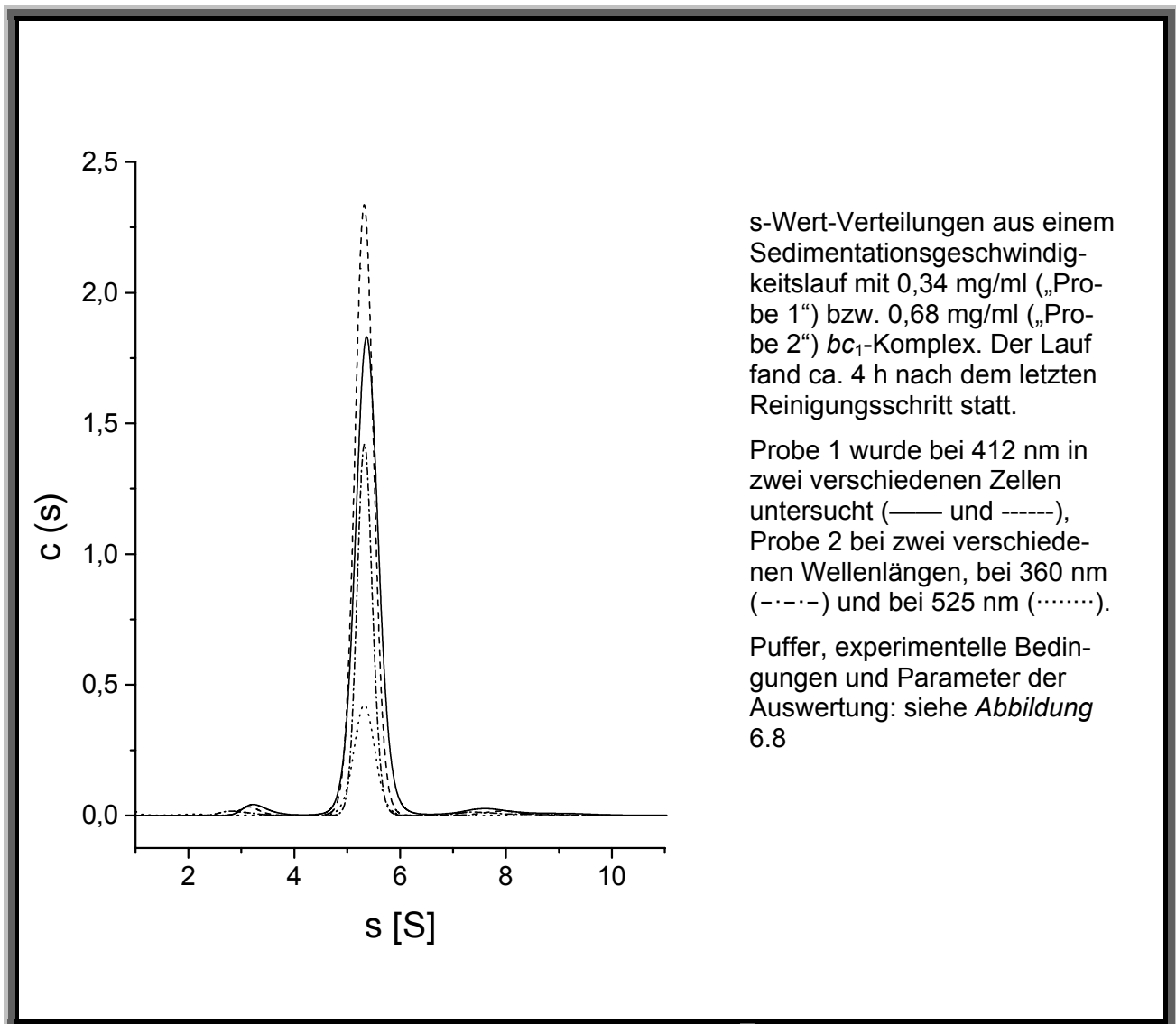


Abbildung 6.12

Die Elutionsprofile der Gelfiltration in *Abbildung 6.2* und *Abbildung 6.7* zeigen ebenso wie die *c(s)*-Plots in *Abbildung 6.8A* und *Abbildung 6.12* – abgesehen von den „Verunreinigungen“ – eine **einheitliche** Substanz (Die Einheitlichkeit läßt sich bereits angesichts der Rohdaten der *s*-Läufe vermuten; ein Beispiel ist in *Abbildung 6.11* zu sehen.). Im folgenden wird dreifach ausgeschlossen, daß sich hinter der mit den beiden Nicht-Gleichgewichtstechniken ermittelten Homogenität des *bc₁*-Komplexes eine Heterogenität in Form einer reversiblen Assoziation verbirgt:

- Sedimentationsgleichgewichtsläufe erlauben das Erkennen von mehreren Komponenten auch dann, wenn diese wechselwirken, da im Gleichgewicht alle dynamischen Parameter

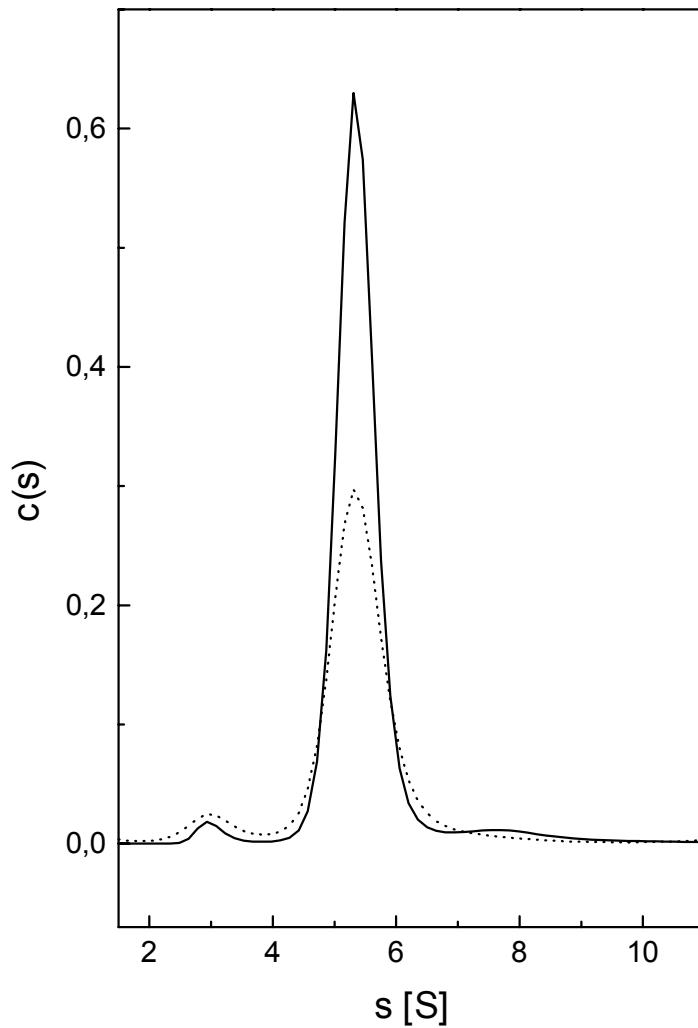
eliminiert sind. Liegen mehrere Komponenten vor, so benötigt die Anpassung auch mehrere Boltzmannverteilungen (dies gilt immer für den Idealfall eines Datensatzes ohne Rauschen, da Boltzmannfunktionen mit verschiedenen Exponenten linear unabhängig sind; „real“ kann eine gegebene statistische Meßunsicherheit dafür sorgen, daß zwei Komponenten nicht voneinander unterschieden werden können). Eine – im Sinne des in Kap. 3.5.2 dargelegten – „gute“ Anpassung eines Gleichgewichtsprofils mit einer einzigen sedimentierenden Komponente ist damit ein Ausweis der Homogenität. Im Falle des *bc₁*-Komplexes gab es Präparate, deren Gleichgewichtszustände sich exzellent mit einer Molmasse anpassen ließen, und welche, deren Anpassung durch Hinzunahme von bis zu 10% einer kleineren Komponente verbessert wurde – in Übereinstimmung mit den oben diskutierten „Verunreinigungen“ (Datensätze und Anpassungen: s.u.).

- „Schnelle“ Assoziationsgleichgewichte verhindern während der Sedimentation die Bildung von bei entsprechend hoher Drehzahl auftretenden Stufen, die den einzelnen Komponenten zuzuordnen wären. Demgemäß erscheinen in der *c(s)*-Analyse, die eine einheitliche Substanz als „schmale“ *s*-Verteilung darstellt (ihre Breite hängt von der Qualität des Datensatzes, der gewählten „F-ratio“ und von der Richtigkeit der eingegebenen Parameter, v.a. \bar{v} und f/f_0 , ab), zwei assoziierende Komponenten tendenziell ebenfalls als eine einzige, allerdings breitere kontinuierliche Verteilung. Darüber, wann eine Verteilung zu breit für die Darstellung einer einzigen Komponente wird, liegen noch zu wenig Erfahrungen bzw. noch kein verlässliches Maß vor. Deshalb wurden in einem Experiment die *c(s)*-Verteilungen des *bc₁*-Komplexes bei zwei deutlich unterschiedlichen Proteinkonzentrationen ermittelt. Im Falle einer Heterogenität mit schneller Assoziation muß eine Verdünnung eine signifikante Verschiebung zu niedrigeren *s*-Werten nach sich ziehen. Wie *Abbildung 6.13* zeigt, ist eine derartige Verschiebung allerdings nicht festzustellen: Der (Haupt-) Peak des Ausgangsmaterials (ca. 0,64 mg *bc₁*-Komplex pro ml; gemessen bei 360 nm) und derjenige der Verdünnung (ca. 0,11 mg/ml; gemessen bei 412 nm) liegen übereinander. Eine Systematik im Verhalten der Nebenpeaks läßt sich vermuten, ist aber nicht signifikant.
- Während man eine Konzentrationsreihe braucht, um mittels *c(s)*-Analyse einem schnellen Assoziationsgleichgewicht auf die Spur zu kommen, reicht im Prinzip ein Experiment bei einer einzigen Konzentration für die Klärung derselben Frage, wendet man die sog. van Holde-Weisheit-Analyse an. Hier wird, wie in Kap. 3.5.1 beschrieben, der Bereich zwischen den Plateaus, die in den zu analysierenden Absorptionsprofilen vorhanden sein

müssen, in Fraktionen eingeteilt, jede Fraktion im Prinzip wie eine Stufe im Sedimentationsprofil, also wie eine unabhängige sedimentierende Komponente behandelt und die *s*-Werte der einzelnen Fraktionen aufgetragen. Ist die untersuchte Substanz uneinheitlich, verändert sich der *s*-Wert mit zunehmender Fraktion zu höheren Werten. Im homogenen Fall erhält man einen senkrechten Plot über dem *s*-Wert der Substanz, wie in *Abbildung 6.8B* zu sehen ist.

Eine (signifikante) reversible Assoziation des *bc₁*-Komplexes findet demnach nicht statt, das Präparat ist homogen.⁵⁴

⁵⁴ Damit kann man das aus einer am *bc₁*-Komplex durchgeführten *c(s)*-Analyse resultierende absolute Maximum dem apparenten Sedimentationskoeffizienten *s** des Proteins zuordnen, unabhängig von der Protein-Konzentration. Aus den *c(s)*-Verteilungen in *Abbildung 6.8A*, *Abbildung 6.12* und *Abbildung 6.13* folgt so ein apparter *s*-Wert des *bc₁*-Komplexes von $s^* = (5,35 \pm 0,03)$ S. Für Standardbedingungen ergibt sich daraus $s_{20,w} = 9,35 \text{ S} \pm 0,35 \text{ S}$, mit folgenden Werten für 4°C: Dichte des Puffers: $\rho = 1,014 \text{ g/ml}$; Viskosität des Puffers: $\eta = 1,634 \text{ cPoise}$. Partialspezifisches Volumen des *bc₁*-Komplexes: $0,749 \text{ ml/g (s.u.)}$. ρ und η wurden mit SEDNTERP berechnet. Die mit der Umrechnung von *s** auf $s_{20,w}$ verbundene zusätzliche Ungenauigkeit wird mit $\Delta s = \pm 0,3 \text{ S}$ veranschlagt (eine Berechnung von ρ und η ist i.A. unsicherer als eine Messung; s. z.B. Hilfedatei von SEDNTERP).



s-Wert-Verteilungen von
0,64 mg/ml bc_1 -Komplex (—;
gemessen bei 360 nm) und
0,11 mg/ml bc_1 -Komplex (···;
gemessen bei 412 nm). Puffer,
experimentelle Bedingungen
und Parameter der Auswer-
tung: siehe *Abbildung 6.8*.

Abbildung 6.13

Zwischenbilanz:

Die Aufklärung der *bc₁*-Komplex-Quartärstruktur mittels analytischer Ultrazentrifugation sollte ursprünglich darüber stattfinden, daß man den Komplex in ein Detergens überführt, dessen Dichte problemlos kompensiert werden kann. Das ist an der Natur des Proteins gescheitert. In 0,02% DDM erwies sich das *bc₁*-Komplex-Präparat umgekehrt als intakt und stabil, die Crux lag nun im methodischen Bereich: Die direkte Bestimmung des DDM-Protein-Verhältnisses im Protein-Detergens-Komplex mithilfe radioaktiv markierten Dodecyl-Maltosids war wegen des hohen (finanziellen) Aufwands ebenso wenig möglich, wie eine DDM-Dichte-Kompensation mithilfe von D₂¹⁸O (durch Extrapolation nach Dichtevariation [118] oder durch Kombination mit z.B. Saccharose), das gegenwärtig nicht kommerziell verfügbar ist.

In einer derartigen Situation ist das oben entwickelte Verfahren, die DDM-Dichte durch Saccharose in Kombination mit D₂O zu kompensieren, die Methode der Wahl. Allerdings hat man gesehen, daß sich die damit verbundene hohe Saccharosekonzentration auf das partialspezifische Volumen des zu untersuchenden Proteins auswirkt. Dieser Umstand wiederum erhöht die Unsicherheit des Meßergebnisses, so daß zum einen ein „unkompliziertes“ Untersuchungsobjekt voraussetzt ist. Wie gesehen ist diese Voraussetzung im vorliegenden Fall erfüllt – ein Präparat mit *bc₁*-Komplex in 0,02% DDM ist rein, das Protein homogen und ausreichend stabil. Ein derartiges Präparat enthält im dichtekompensierten Fall lediglich eine einzige, bezüglich des oligomeren Zustands zu charakterisierende sedimentierende Komponente, die im Sedimentationsgleichgewicht nur den Proteinanteil zeigt. Zum anderen ist das partialspezifische Volumen des im Saccharose+D₂O/ DDM-System vorliegenden *bc₁*-Komplexes zu ermitteln.

6.5 Das partialspezifische Volumen des *bc₁*-Komplexes

Zur Bestimmung von \bar{v}_{bc1} , dem partialspezifischen Volumen des in 50 mM MES/NaOH (pH 6,0); 300 mM NaCl; 0,02% (w/v) DDM; 27,6% (w/v) Saccharose; 95/5 (v/v) D₂O/H₂O vorliegenden *bc₁*-Komplexes, wurde es zerlegt in $\bar{v}_{c,bc1}$, dem für Standardbedingungen kalkulierten partialspezifischen Volumen des *bc₁*-Komplexes, und ein Korrekturinkrement $\Delta \bar{v}$:

$$\bar{v}_{bc1} = \bar{v}_{c,bc1} + \Delta \bar{v}$$

Summand 1:

Das partialspezifische Volumen des Proteinanteils des Komplexes wurde aus den bekannten Aminosäurezusammensetzungen der einzelnen Untereinheiten [67] nach Cohn/ Edsall [20]

[34] für in Wasser gelöstes Protein bei 25°C berechnet. Nach Berücksichtigung des (geringen) Beitrags der Häm-Gruppen ($\bar{v}_{\text{Häm}} \approx 0,82 \text{ ml/g}$ (H. Durchschlag)) ergab sich:

$$\bar{v}_{c, bc1} = 0,738 \text{ ml/g}$$

Summand 2:

Zur Ermittlung des Inkrements $\Delta \bar{v}$ wurden die entsprechenden \bar{v} -Werte der Cytochrom *c*-Oxidase herangezogen (s. Kap. 5.3): Das in 50 mM MES/NaOH (pH 6,0); 300 mM NaCl; 0,02% (w/v) DDM; 27,6% (w/v) Saccharose; 95/5 (v/v) D₂O/H₂O gemessene partialspezifische Volumen, $\bar{v}_{cCo} = 0,782 \text{ ml/g}$, und das für Standardbedingungen (Wasser, 25°C) berechnete, $\bar{v}_{c,CcO} = 0,753 \text{ ml/g}$. Die Differenz dieser beiden Werte wurde mit dem Inkrement identifiziert:

$$\Delta \bar{v} = \bar{v}_{cCo} - \bar{v}_{c,CcO} = + 0,029 \text{ ml/g}$$

Begründung: Abgesehen von den identischen Versuchsbedingungen bzw. von der identischen Kalkulationsgrundlage gibt es eine Reihe von Übereinstimmungen zwischen der Cytochrom *c*-Oxidase und dem *bc₁*-Komplex: Beide sind integrale Membranproteine, unter den gegebenen Bedingungen stabil, rein und einheitlich; beide sind Glieder der Atmungskette desselben Bakteriums; beide sind Häm-haltige Komplexe, zusammengesetzt aus wenigen Untereinheiten, mit größenordnungsmäßig gleichen Protomer-Molmassen.

Ergebnis:

$$\bar{v}_{bc1} = (0,738 + 0,029) \text{ ml/g} = \mathbf{0,767 \text{ ml/g}}$$

6.6 Die Untersuchung des *bc₁*-Komplexes unter der Bedingung der Dichtekompensation

Der gereinigte *bc₁*-Komplex wurde wie in *Anhang 2* beschrieben bei 4°C in den Kompensationspuffer – 50 mM MES/NaOH (pH 6); 300 mM NaCl; 0,02% (w/v) DDM; 27,6% (w/v) Saccharose; 95/5 (v/v) D₂O/H₂O – überführt. Fünf derartige Proben (ca. 0,13 mg *bc₁*-Komplex pro ml) wurden einer Sedimentationsgleichgewichtsanalyse unterzogen (Rotor-drehzahl: 18 000 Upm; Rotortemperatur: 4°C; Meßwellenlänge: 412 nm; Füllmenge pro Kammer: 110 µl). Die Gleichgewichtsprofile wurden mit freier Basislinie und einer effektiven Molmasse angepaßt, wobei letztere variiert und gegen σ bzw. gegen $(\sigma - \sigma_{\min})/\sigma_{\min}$ (σ_{\min} : minimale Fehlerquadratsumme) aufgetragen wurde (die zweite Auftragungsart ermöglicht eine unmittelbare Abschätzung des statistischen Fehlerbereichs, der vom 10%-Konfidenzniveau definiert ist; s. punktierte Linie in *Abbildung 6.14B*). Aus den Minima dieser

fünf Funktionen, von denen zwei in *Abbildung* 6.14 dargestellt sind (*Abbildung* 6.14A: σ gegen M_{eff} , *Abbildung* 6.14B: $(\sigma - \sigma_{\text{min}})/\sigma_{\text{min}}$ gegen M_{eff}), ergab sich die effektive Molmasse des bc_1 -Komplexes zu $M_{\text{eff}} = (19,6 \pm 0,1) \text{ kDa}$.

Die Anpassungen der beiden Datensätze, die den Funktionen in *Abbildung* 6.14 zugrunde liegen, mit den aus den Funktionen hervorgehenden optimalen effektiven Molmassen sind zu sehen in *Abbildung* 6.15. Die sehr hohe Qualität dieser Anpassungen, die auf einer einzigen sedimentierenden Komponente beruhen, zeigt sowohl die Homogenität der Proben als auch, daß Nichtidealitäten keine Rolle spielen.

Die Berechnung der Molmasse der sedimentierenden Komponente ergab gemäß $M_{\text{eff}} = M(k - \bar{v} \rho)$:

$$M = 240 \text{ kDa } (\pm 30 \text{ kDa})^{55},$$

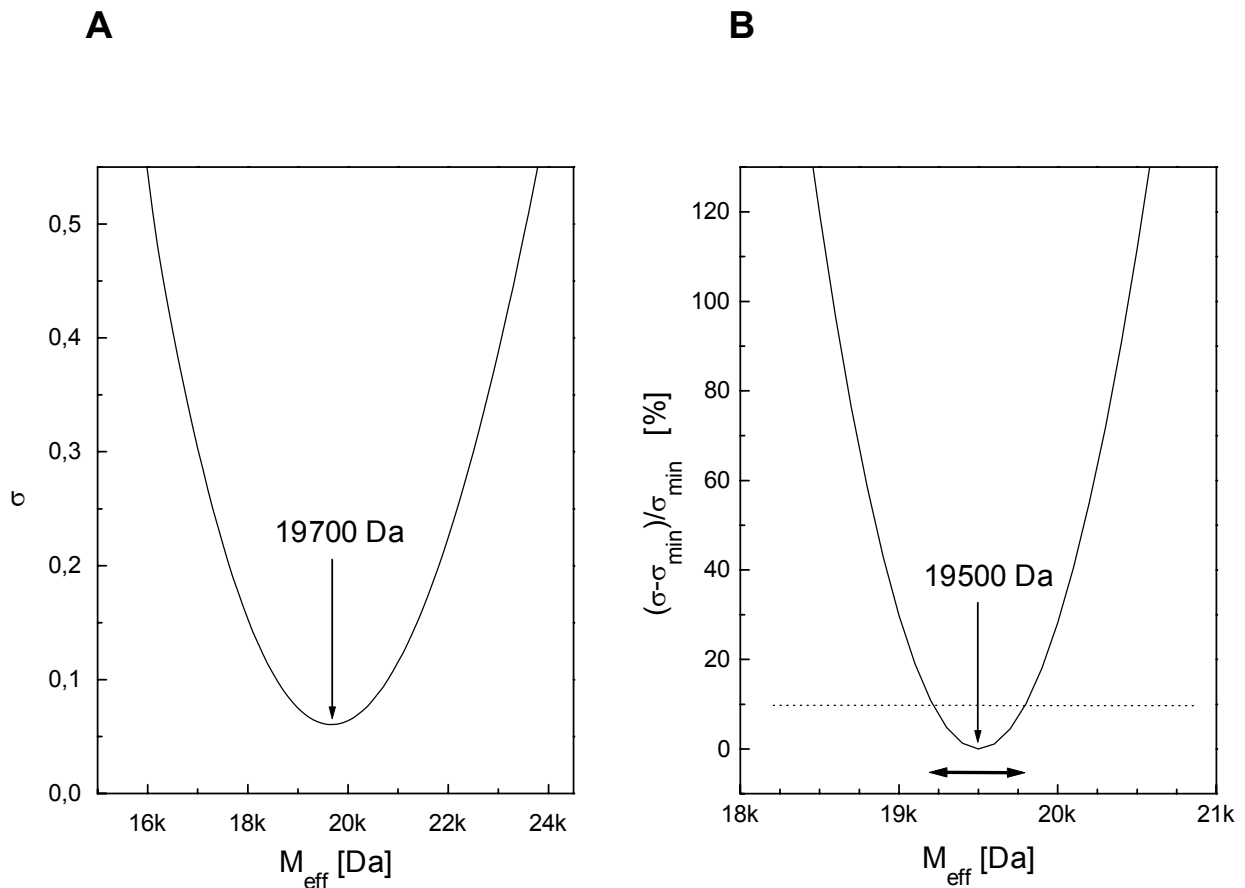
mit $M_{\text{eff}} = 19,6 \text{ kDa}$; $\rho = 1,207 \text{ g/ml}$; $k = 1,0074$; $\bar{v} = 0,767 \text{ ml/g}$. (aufgrund infrarotspektroskopischer Daten wurde zur Berechnung von k angenommen, daß nur an ca. 50% der H-D-Austausch-fähigen Gruppen tatsächlich H-D-Austausch stattfindet;⁵⁶ der Rest wird offenbar vom Detergens abgeschirmt).

Da das bc_1 -Komplex-Protomer – bestehend aus drei Untereinheiten einschließlich dreier Hämgruppen und eines $[2\text{Fe}\cdot 2\text{S}]$ -Zentrums – eine Molmasse von 117 kDa besitzt, ergibt sich aus dem Ergebnis für M eine $(2,05 \pm 0,26)$ -fache Monomeren-Molmasse des Enzyms. Damit läßt sich festhalten:

Der bc_1 -Komplex von *Paracoccus denitrificans* liegt in DDM-Lösung als Dimer vor. Andere Oligomere konnten im Sedimentationsgleichgewichtsexperiment nicht nachgewiesen werden.

⁵⁵ Die Fehlerangabe benennt den **Maximalfehler**. Der Berechnung liegen neben dem Fehlerfortpflanzungsgesetz folgende Fehlerabschätzungen zugrunde: M_{eff} ca. 0,5%; ρ ca. 0,2%; k ca. 0,1%; \bar{v} ca. 1% Fehler.

⁵⁶ Michaela Ritter, persönliche Mitteilung.



Auswertung der im Sedimentationsgleichgewicht gemessenen $A(r)$ -Profile zweier Proben (**A** und **B**) mit 0,13 mg/ml bc_1 -Komplex in 50 mM MES/NaOH (pH 6); 300 mM NaCl; 0,02% (w/v) DDM; 27,6% (w/v) Saccharose; 95/5 (v/v) D_2O/H_2O (Experimentelle Bedingungen: Rotorgeschwindigkeit: 18000 Upm; Rotortemperatur: 4°C; Meßwellenlänge: 412 nm): Der jeweilige Datensatz wurde mit freier Basislinie und einer variablen effektiven Molmasse angepaßt und die Fehlerquadratsumme σ (**A**) bzw. ihre auf die minimale Fehlerquadratsumme σ_{min} bezogene Erhöhung $\sigma - \sigma_{\text{min}}$ (**B**) gegen die effektive Molmasse M_{eff} aufgetragen (optimale Anpassung mit $M_{\text{eff}} = 19,7$ kDa (**A**) bzw. $M_{\text{eff}} = 19,5$ kDa (**B**)). Die in **B** gewählte Art der Auftragung verdeutlicht den statistischen Fehlerbereich (Doppelpfeil), definiert über eine Erhöhung der Fehlerquadratsumme um 10% (punktierter Linie).

Abbildung 6.14

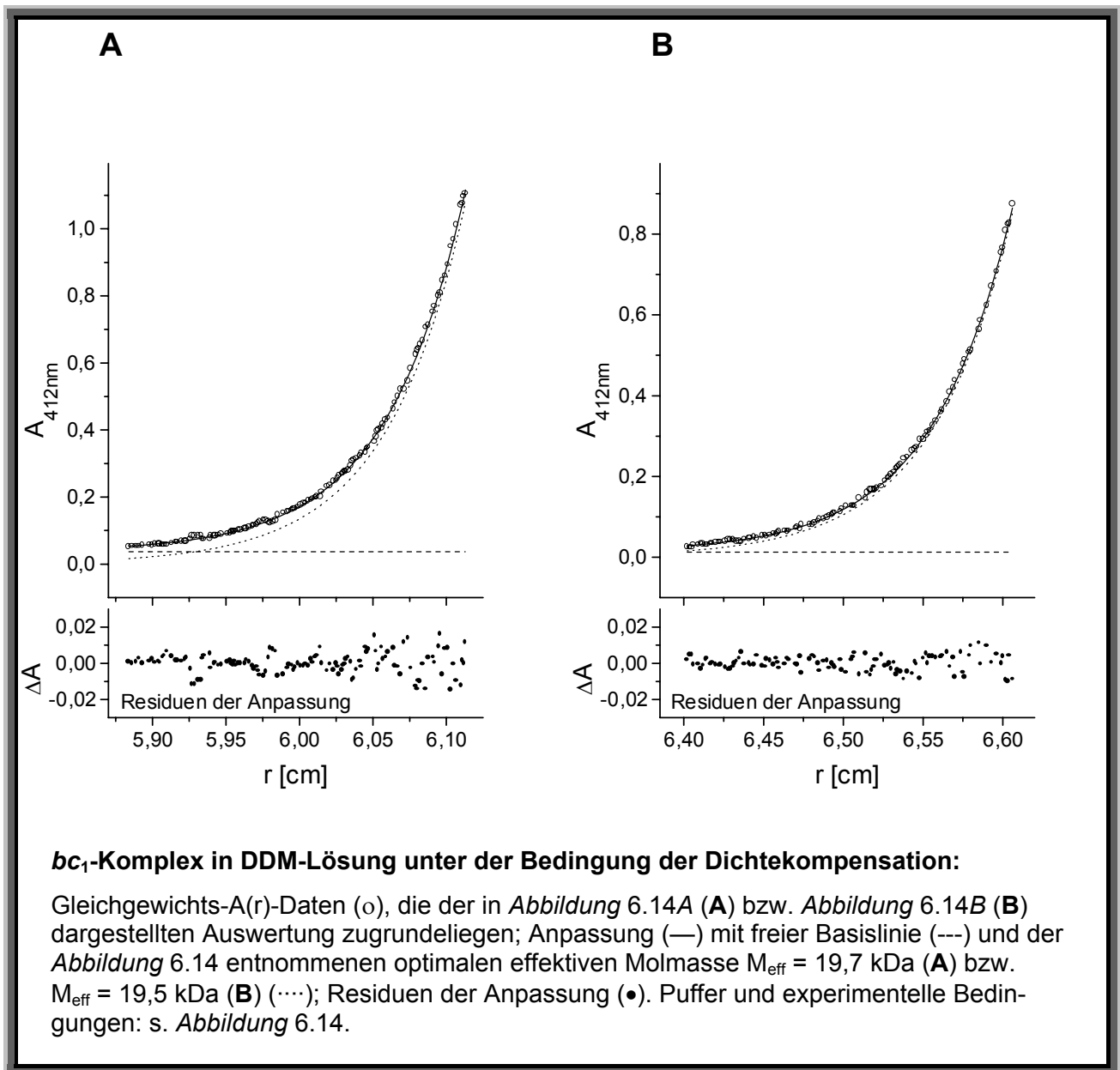
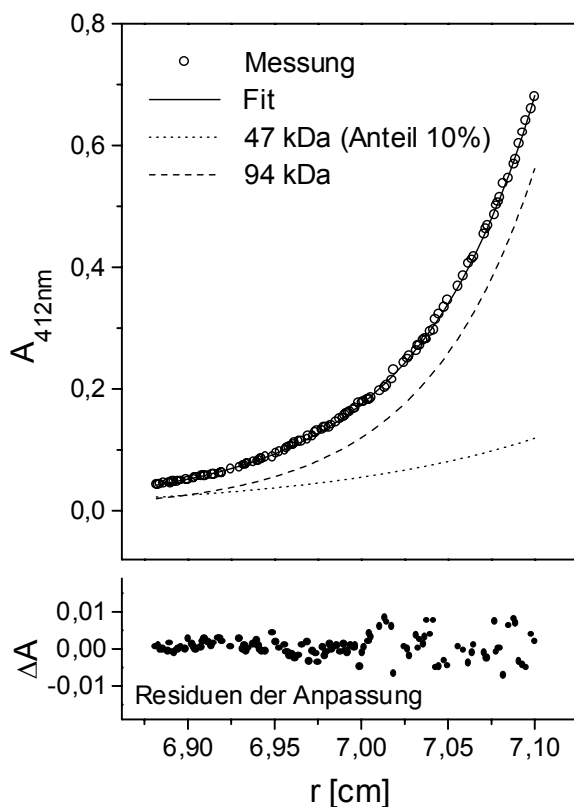


Abbildung 6.15

6.7 Bestimmung der an den *bc₁*-Komplex bindenden DDM-Menge

Aus den Daten eines Sedimentationsgleichgewichtsexperiments mit *bc₁*-Komplex in saccharose- und D₂O-freiem MES-Puffer (50 mM MES/NaOH (pH 6); 300 mM NaCl; 0,02% (w/v) DDM; „pH 6“) wurde das Massenverhältnis zwischen proteingebundenem Dodecylmaltosid und Protein, M_D/M_P , bestimmt. Die Berechnung basiert auf dem obigen Ergebnis, das den *bc₁*-Komplex als Dimer ausweist.

Der Sedimentationsgleichgewichtslauf wurde mit 0,08 bis 0,09 mg *bc₁*-Komplex pro ml in 3 Probenkammern durchgeführt (Rotorgeschwindigkeit: 7 000 Upm; Rotortemperatur: 4°C; Meßwellenlänge: 412 nm; Füllmenge pro Kammer: 120 µl). Aus den Gleichgewichtsprofilen wurde die optimale effektive Molmasse der sedimentierenden (Haupt-) Komponente ermittelt. Die Auswertung wurde durchgeführt mit freier Basislinie und einer Komponente bzw. mit freier Basislinie, einer Hauptkomponente und einer Komponente, deren Anteil an der Gesamtabsorption auf 10% (s.o.) und deren Molmasse auf etwa die Hälfte der Molmasse der Hauptkomponente (s. *Abbildung 6.10*) festgelegt wurde. Die Hinzunahme der kleineren Komponente verbesserte die Anpassung eines der drei Gleichgewichtsprofile signifikant, die Anpassung der übrigen wenig bzw. nicht. *Abbildung 6.16* zeigt ein Beispiel der Auswertung.



Sedimentationsgleichgewichtsanalyse von ca. 0,08 mg/ml *bc₁*-Komplex in DDM-Lösung (ohne Dichtekompensation):

Anpassung der im Gleichgewicht gemessenen $A(r)$ -Daten mit freier Basislinie, einer Komponente, deren effektive Molmasse (47 kDa) und Anteil an der Gesamtabsorption (10%) vorgegeben sind, und einer Komponente mit über die Fehlerquadratsumme optimierter effektiver Molmasse (94 kDa, sie wird dem intakten *bc₁*-Komplex zugeschrieben).

Puffer: 50 mM MES/NaOH (pH 6); 300 mM NaCl; 0,02% (w/v) DDM. Experimentelle Bedingungen: Rotorgeschwindigkeit: 7000 Upm; Rotortemperatur: 4°C; Meßwellenlänge: 412 nm.

Abbildung 6.16

Das Ergebnis: Die effektive Molmasse des *bc₁*-Komplex-DDM-Komplexes in „pH 6“ beträgt $M_{\text{eff}} = (91 \pm 5) \text{ kDa}$. Der große Fehler (Maximalfehler) folgt aus der Möglichkeit des Vorhandenseins der kleinen Komponente bzw. der ihr entsprechenden Verunreinigungen.

Bezeichne man nun die dimere Form mit dem hochgestellten „d“ und setze die Indizes „P“, „D“ bzw. „PDK“ für „Protein“, „Detergens“ bzw. „Protein-Detergens-Komplex“, so folgt mit $M_{\text{eff}} = 91 \text{ kDa} = {}^dM_{\text{PDK}} (1 - \bar{v}_{\text{PDK}} \rho) = {}^dM_{\text{P}} (1 - \bar{v}_{\text{P}} \rho) + {}^dM_{\text{D}} (1 - \bar{v}_{\text{D}} \rho)$, wenn man nach ${}^dM_{\text{D}}$ auflöst und das Verhältnis zu ${}^dM_{\text{P}}$ bildet:

$$M_{\text{D}}/M_{\text{P}} = 0,85 \pm 0,12 \text{ (w/w)}$$

Die eingesetzten Werte sind ${}^dM_{\text{P}} = 234 \text{ kDa}$; $\bar{v}_{\text{P}} = 0,749 \text{ ml/g}$; $\bar{v}_{\text{D}} = 0,814 \text{ ml/g}$ (s. [118]); $\rho = 1,014 \text{ g/ml}$ (berechnet mit SEDNTERP). Der Wert für \bar{v}_{P} kam wie folgt zustande: Zum berechneten partialspezifischen Volumen des *bc₁*-Komplexes ($\bar{v}_{\text{c}} = 0,738 \text{ ml/g}$) wurde ein Inkrement $\Delta \bar{v}$ addiert, das wie das Inkrement für den dichtekompensierten Fall den \bar{v} -Werten für die Cytochrom *c*-Oxidase entnommen ist: Die Differenz zwischen dem gemessenen \bar{v} der Cytochrom *c*-Oxidase in saccharosefreier Detergenslösung ($\bar{v} = 0,764 \text{ ml/g}$) und ihrem kalkulierten \bar{v} ($\bar{v}_{\text{c}} = 0,753 \text{ ml/g}$) beträgt $\Delta \bar{v} = +0,011 \text{ ml/g}$.

Führt man die Berechnung des DDM/*bc₁*-Komplex-Massenverhältnisses unter der Annahme durch, daß der oligomere Zustand des *bc₁*-Komplexes monomer ist, folgt, daß 1 g Protein mehr als 2,8 g DDM binden würde – sehr/ zu viel, zieht man entsprechende Werte anderer Membranproteine zum Vergleich heran. Nimmt man an, der *bc₁*-Komplex sei trimer, erhält man $M_{\text{D}}/M_{\text{P}} < 0,2 \text{ (w/w)}$ – sehr/ zu wenig, angesichts der Vergleichswerte. Schließlich liefert die Annahme eines tetrameren oder höher aggregierten Proteins negative $M_{\text{D}}/M_{\text{P}}$ -Werte; sie ist also sicher falsch.

In *Tabelle 6-1* sind die Ergebnisse der $M_{\text{D}}/M_{\text{P}}$ -Berechnung zusammengefaßt. Die $M_{\text{D}}/M_{\text{P}}$ -Werte der Vergleichsproteine sind in *Tabelle 6-2* aufgelistet ($M_{\text{D}} = M_{\text{DDM}}$).

Tabelle 6-1

<i>bc₁</i>-Komplex	
Angenommene Komplexgröße	M_D/M_P (w/w)
Monomer	2,8-3,3
Dimer	0,85 ± 0,12
Trimer	< 0,2
Tetramer	nicht möglich

Tabelle 6-2

Vergleichsproteine	
Protein	M_D/M_P (w/w)
Lichtsammler LH III (<i>R. molischianum</i>)	1,20 [118]
Photosystem I (<i>S. PCC 7002</i>)	0,48 [150]
NO-Reduktase (<i>P. denitrificans</i>)	0,87 [53]
Cytochrom <i>c</i> -Oxidase (Rinderherz)	0,55 [136] bis 0,64 [11]
Cytochrom <i>c</i> -Oxidase (<i>P. denitrificans</i>)	ca. 1,1 (s.o.)
Laktose-Transporter (<i>S. thermophilus</i>)	1,43 [39]

Der Vergleich der Werte aus *Tabelle 6-1* mit denen aus *Tabelle 6-2* liefert eine Bestätigung nicht nur des über Dichtekompensation erhaltenen Ergebnisses, sondern auch des Kompensationsverfahrens selbst.

Ein in DDM-Lösung vorliegender dimerer *bc₁*-Komplex mit M_D/M_P = 0,85 besitzt einschließlich des proteingebundenen Detergens' eine molare Masse von 433 kDa. Dies entspricht etwa der Molmasse von 410 kDa, die aus der in *Abbildung 6.10* dargestellten c(M)-Analyse des intakten *bc₁*-Komplexes (durchgezogene Linie) hervorgeht. Für den in der selben *Abbildung* gezeigten (partiell) zerfallenen Komplex (gestrichelte Linie) erhält man eine Molmasse von ca. 390 kDa, was sich mit einer (partiellen) Loslösung des Eisen-Schwefel-Proteins aus dem

Verband erklären ließe (vgl. *Abbildung* 6.6). Darüber hinaus läßt sich aus der Bildung einer Komponente mit etwa der halben Dimeren-Molmasse – vgl. Nebenpeak von Präparat 2) in *Abbildung* 6.10 – vermuten, daß die Stabilität des Dimeren an das Vorhandensein der Eisen-Schwefel-Untereinheit geknüpft ist (vgl. hierzu Montoya et al. [86]: die Autoren untersuchten den *bc₁*-Komplex von *Rhodovulum sulfidophilum* und kamen zu einem analogen Schluß).

6.8 Diskussion

Die Untersuchung am *bc₁*-Komplex bekräftigte die Einschätzung aus Abschnitt 5, derzufolge das neue DDM-Kompensationsverfahren bei einfach strukturierten Problemen zuverlässig ist, sofern wie im vorliegenden Fall ein geeignetes Testprotein für die \bar{v} -Korrektur zur Verfügung steht: Die für das Protein nach erfolgter Korrektur erhaltene Molmasse entsprach sehr genau der *bc₁*-Komplex-Dimer-Molmasse, ein Ergebnis, das sehr gut zu den Resultaten der bisher untersuchten *bc₁*-Komplexe, die allesamt als Dimere gelten, paßt.

Allerdings ist dieser Befund nur für den **mitochondrialen** *bc₁*-Komplex gesichert, da einige seiner Vertreter (von Säugetieren und Vögeln stammend sowie aus Hefe [57] [58] [170] [175]) kristallisiert und damit einer Röntgenstrukturanalyse unterzogen werden konnten (die darüber ermittelte 3D-Struktur des Enzyms schließt seine Quartärstruktur mit ein). Im Falle des bakteriellen *bc₁*-Komplexes blieb dieser unmittelbare Zugang zur Quartärstruktur (bisher) verwehrt, da (noch) kein Vertreter kristallisiert werden konnte.

Zum oligomeren Zustand des **bakteriellen** Enzyms gibt es lediglich zwei Arbeiten: Montoya et al. beschreiben den in DDM solubilisierten *bc₁*-Komplex von *Rhodovulum sulfidophilum* auf Basis einer Gelfiltrationsanalyse als Dimer [86], dasselbe Resultat erhielten Sone und Takagi für das Enzym des thermophilen Bakteriums PS3 in Lösung von Polyoxyethylen 8 Lauryl ether (C₁₂E₈) [129]. Letztere analysierten das Protein mittels in Reihe geschalteter Messung von UV-Absorption, Lichtstreuung und Brechungsindex des Eluats einer Gelfiltrationschromatographie. Mit gewissen Einschränkungen⁵⁷ ist man mit dieser Methodik in Verbindung mit bestimmten Zusatzmessungen und der entsprechenden Auswertung (näheres in [49]) in der Lage, den oligomeren Zustand (und das Detergens-Protein-Verhältnis M_D/M_P) eines integralen Membranproteins direkt zu bestimmen. Dagegen sind große systematische Irrtümer möglich, verwendet man lediglich Gelfiltration zur Bestimmung von Quartär-

⁵⁷ Die Interpretation der Meßgröße dn/dc_p (n : Brechungsindex der Proteinlösung; c_p : Konzentration des Protein-Detergens-Komplexes) beruht auf empirischen Daten (s. z.B. [49]).

strukturen [89] [138]: Eine Molmassenabschätzung durch Gelfiltration ist zwar schnell und einfach, weswegen sich dieses Verfahren großer Beliebtheit in der Biochemie erfreut. Allerdings wird durch Gelfiltration die Molmasse nicht direkt bestimmt, sondern durch Vergleich des Elutionsvolumens des Untersuchungsobjekts mit denjenigen von Proteinen bekannter Molmasse. Dieser Vergleich ist nur zulässig, wenn Untersuchungsobjekt und Kalibrationsproteine hinsichtlich des Reibungskoeffizienten, also hinsichtlich der Form vergleichbar sind – und dies dürfte in der Regel nicht gegeben sein. Ebenso wenig bekannt ist bei Membranproteinen im Allgemeinen die Menge des proteingebundenen Detergens, die Größe bzw. Molmasse des zu untersuchenden Partikels mitbestimmt.

Somit kann man festhalten, daß es bislang zwei Nachweise der dimeren Natur bakterieller *bc₁*-Komplexe gab – einen strengen und einen weniger strengen –, die nun durch das Resultat der vorliegenden Arbeit (in der ein strenges Nachweisverfahren angewendet wurde) ergänzt werden. Dies läßt den induktiven Schluß zu, daß es eine allgemeine Eigenschaft des bakteriellen *bc₁*-Komplexes ist, ebenso wie der mitochondriale als stabiles Dimer vorzuliegen – in Lösungen geeigneter nichtionischer Detergenzien und damit aller Wahrscheinlichkeit nach auch in der Membran (vgl. [51] [138]).

Die Übereinstimmung zwischen mitochondrialem und bakteriellem *bc₁*-Komplex hinsichtlich des oligomeren Zustands ist nicht selbstverständlich: Das mitochondriale Enzym ist deutlich größer als sein Pendant, seine Vertreter enthalten bis zu 8 Untereinheiten mehr. Dadurch dürften sich die Vorgänge hinsichtlich einer Selbstassoziation deutlich unterscheiden. Sind dennoch **alle** *bc₁*-Komplexe Dimere, deutet das darauf hin, daß der dimere Zustand eine **funktionelle Notwendigkeit** des *bc₁*-Komplexes darstellt. Nun zeigte die Analyse der verschiedenen Kristalle mitochondrialer Enzyme, daß die Eisen-Schwefel-Untereinheit des Komplexes keine feste Position am Protein einnimmt; weiterhin offenbaren die Kristallstrukturen, daß die Eisen-Schwefel-Domäne eines in einem Dimer organisierten Protomeren mit den Cytochromen *b* und *c₁* des **anderen** Protomeren wechselwirkt. Daraus ergibt sich die Vorstellung, daß die Eisen-Schwefel-Untereinheit Elektronen transportiert, indem sie in einem **Dimer** zwischen den Cytochromen *b* und *c₁* **pendelt**. Demzufolge ist der dimere Zustand des mitochondrialen *bc₁*-Komplexes notwendige Voraussetzung der Enzymfunktion.

Da der *bc₁*-Komplex von *Paracoccus denitrificans* ausschließlich aus für die Enzymfunktion notwendigen Untereinheiten besteht, ergibt sich aus dem Wissen über den dimeren Zustand dieses Proteins ein Hinweis darauf, daß die katalytische Rolle des Dimeren – und darüber hinaus der aus den Kristallstrukturen abgeleitete Mechanismus – **universell** gilt.

7 Anwendung II: Die Selbstassoziation des Bande 3-Proteins der menschlichen Erythrozytenmembran

7.1 Das Problem

Zum Assoziationsverhalten des Bande 3-Proteins der menschlichen Erythrozytenmembran gibt es zahlreiche Publikationen, deren Ergebnisse bzw. Schlußfolgerungen allerdings erheblich divergieren. So wird die Bande 3 im nativen Zustand von einigen (sehr beachteten) Autoren als stabiles Dimer beschrieben [16] [18] [62] [164] [173]. Andere fanden ein Gemisch aus Dimer und Tetramer [9] [93] [97] [98] [168] (wobei in [93] das Tetramer als Präparationsartefakt bezeichnet wird), wieder andere zusätzlich höhere Aggregate wie z.B. Hexamer [29] [142] [168]. Einigen früheren Untersuchungen zufolge ist monomere Bande 3 ein Bestandteil des nativen Zustands [76] [90] [111] [113] [120], eine Ansicht, die – zwischenzeitlich in den Hintergrund geraten – von Veröffentlichungen jüngeren Datums neue Nahrung erhält [103] [142]. Über die Uneinigkeit bezüglich der vorkommenden Oligomere hinaus existiert ein Pluralismus im Hinblick auf die Stabilität/ Reversibilität eines oligomeren Zustandes, der vom bereits erwähnten stabilen Dimer bis zu einem Monomer-Dimer-Tetramer-Assoziationsgleichgewicht [31] [90] [113] reicht (Reversibilität wird außerdem beschrieben bzw. in Betracht gezogen in: [98] [104] [142]).

Eine notwendige Folgeerscheinung der widersprüchlichen Urteile zum Assoziationsverhalten der Bande 3 sind divergierende Meinungen zum Verhältnis zwischen wohlbekannten Funktionen des Proteins und seiner Quartärstruktur. So ist nach [71] (außerdem gemäß [62] und [105]) die funktionelle Einheit des Anionenaustauschs das Bande 3-Monomer, während nach [163] der Ionentransport zwischen den Protomeren eines Dimeren stattfindet. Ähnliche Uneinigkeit ist im Zusammenhang mit der Bande 3-Ankyrin-Assoziation, der Hauptbindung zwischen Lipiddoppelschicht und Zytoskelett, zu beobachten: Hierfür ist gemäß [30] [82] [87] [166] die tetramere Form der Bande 3 erforderlich, gemäß [93] bzw. – als Voraussetzung – in [84] die dimere.

Aus dem Gesagten geht zum einen hervor, daß weitere Untersuchungen der Bande 3-Selbstassoziation nötig sind; zum anderen, daß diese sich nicht damit begnügen sollten, die Meinungsvielfalt zu bereichern: Es gilt die Vielfalt zu entscheiden, indem man den Grund/ die Gründe für die widersprüchlichen Ergebnisse aufspürt. Dabei gerät in erster Linie die Präparation der Bande 3 ins Blickfeld. Denn die Voraussetzung einer Zentrifugenanalyse –

der Methode der Wahl –, die Solubilisierung und Aufreinigung des Proteins, birgt generell die Gefahr in sich, den Zustand des Proteins undefiniert zu modifizieren, es zu schädigen. Da es schwer vorstellbar ist, daß eine beträchtliche Anzahl von Arbeitsgruppen methodische Fehler begeht, liegt der Verdacht nahe, daß das Untersuchungsobjekt je nach Präparation in unterschiedlichen Zuständen vorliegt. Dies wird erhärtet durch die Beobachtung aus der Arbeitsgruppe, aus der diese Untersuchung hervorgeht, wonach selbst bei identischem Präparationsprotokoll über die Jahre hinweg erhebliche Schwankungen in den Ergebnissen zu verzeichnen sind.

Wenn auch der präparative Aspekt im Vordergrund steht: die methodische Seite der Bande 3-Analyse kann durchaus tückisch sein. So ist für den Fall, daß ein gegebenes Bande 3-Präparat mehrere sedimentierende Komponenten enthält, eine Sedimentationsgleichgewichtsanalyse mit großer Ungenauigkeit behaftet. Zudem können Änderungen des Proteinzustands im Zeitrahmen von Gleichgewichtsläufen mit diesen nicht bzw. schwer erfaßt werden. Umgekehrt kann eine Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse, selbst mit modernsten Auswertemethoden, fehlerhafte Resultate liefern, wenn reversible Assoziationen mit hinreichend schneller (Assoziations-) Gleichgewichtseinstellung eine Rolle spielen.

Somit ist man bei der Analyse der Bande 3-Selbstassoziation sowohl mit der Frage nach einer möglichst schonenden Präparation als auch – voraussichtlich – mit methodischen Schwierigkeiten konfrontiert. In der vorliegenden Arbeit wurde dementsprechend zum einen das etablierte Präparationsprotokoll modifiziert. Zum anderen wurden Dichtekompensationsverfahren angewendet, insbesondere die in Abschnitt 5 etablierten, auf dem Einsatz von Saccharose und Glycerin beruhenden Verfahren. Diese bieten sich in doppelter Hinsicht an: Neben der Eliminierung einer aus freien Detergentsmizellen bestehenden zusätzlichen sedimentierenden Komponente und der „Unsichtbarmachung“ des proteingebundenen Detergens` im Sedimentationsgleichgewicht leisten Saccharose und Glycerin tendenziell eine Stabilisierung des nativen Zustands des Proteins.

7.2 Die Präparation des Bande 3-Proteins

Reine, in wäßriger Lösung befindliche Bande 3 wurde im Prinzip wie folgt gewonnen: Die Erythrozytenmembran einschließlich Membranskelett wurde zunächst vom Zytoplasma getrennt, um anschließend mittels milder Extraktion von – im wesentlichen – Glykophorinen befreit zu werden. Die darauffolgende – weniger milde – Extraktion löste das Bande 3-Protein aus der Membran (beide Extraktionsschritte beruhten auf dem Einsatz nichtionischer

Detergenzien). Die solubilisierete Bande 3 wurde schließlich via Ionenaustauscherchromatographie aufgereinigt und über Gelfiltration in die endgültige Pufferlösung überführt.

Die Präparation orientierte sich an der in [116] und weiter in [90] ausgearbeiteten Vorgehensweise. Angesichts der Vermutung, daß die großen Differenzen in der Literatur bezüglich des Bande 3-Assoziationszustandes wesentlich präparativen Ursprungs sind, wurde dieses „Rezept“ zur Isolierung der Bande 3 in einer für Ultrazentrifugenuntersuchungen geeigneten Form an einigen Stellen modifiziert.

Die Schritte, bei 4°C bzw. auf Eis mit entionisiertem, entgastem Wasser durchgeführt, im Detail:

7.2.1 Stromapräparation

Die Herstellung von reiner Erythrozytenmembran (Stroma) erfolgte nach [116]. Im einzelnen: 250-300 ml (ein Beutel) Erythrozytenkonzentrat (Blutgruppe 0Rh⁺) wurde gefiltert, um verbliebene Leukozyten, Träger einer hohen proteolytischen Aktivität, abzutrennen (Leukozytenfilter: Sepacell R-200 (II) AS; Diamed). Die Erythrozyten wurden mit isotonischer Kochsalzlösung (10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl) mehrfach gewaschen (Zentrifugation: 10 min bei 3 000 Upm; Zentrifuge: Sorvall Superspeed RC2-B; Rotor: Sorvall SH 3000) und anschließend in ca. 2,5 l 10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA hypotonisch lysiert.⁵⁸ Das Lysat wurde auf sechs 500 ml-Polycarbonat-Flaschen verteilt und zentrifugiert (Zentrifugation: 15 min bei 10 000 Upm; Zentrifuge: Sorvall Superspeed RC2-B; Rotor: Sorvall GS-3). Zum Waschen der im Pellet gesammelten geöffneten Erythrozyten wurde das Pellet in 10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA aufgenommen (250 ml pro Flasche) und nach Hinzufügen von 3 M NaCl (10 ml pro Flasche)⁵⁹ erneut für 15 min bei 10 000 Upm zentrifugiert. Diese Waschprozedur wurde wiederholt, bis die Zellmembranen weiß waren, d.h. bis die Zytoplasmabestandteile, insbesondere Hämoglobin, aus den geöffneten Erythrozyten weitgehend entfernt waren (beim letzten Waschgang wurden pro Flasche nur noch 2,5 ml 3 M NaCl hinzugegeben).⁶⁰ Zur Entfernung von NaCl wurden die Membranen anschließend für

⁵⁸ EDTA wurde zum Schutz vor Metalloproteasen eingesetzt.

⁵⁹ Der Zusatz von NaCl sorgt für ein festeres Pellet.

⁶⁰ Die Zentrifugationen der ersten Waschgänge lieferten neben einem aus den Erythrozytenmembranen bestehenden relativ lockeren Pellet ein kleines, sehr festes Pellet mit vermutlich hoher proteolytischer Aktivität, welches gründlich entfernt wurde (durch Absaugen).

4 h gegen ca. 5 l Wasser dialysiert. Schließlich wurden die dialysierten Membranen mit Wasser verdünnt, bis zu einer Gesamtproteinkonzentration entsprechend einer Absorption von 2 OD (Wellenlänge: 280 nm; Schichtdicke: 1 cm).⁶¹

Das so gewonnene Stroma diente als Ausgangsmaterial für die Extraktion und Aufreinigung der Bande 3. Es wurde, wenn nicht frisch verwendet, bei -20°C oder -40°C aufbewahrt (in 10 ml-Portionen). Unter diesen Bedingungen war es über viele Monate hinweg haltbar.

7.2.2 Vorextraktion

Die Vorextraktion soll die Erythrozytenmembranen weitgehend von Glykophorinen und Proteasen befreien, ohne ihren Bande 3-Gehalt (deutlich) zu vermindern. Dies leistete in der Vergangenheit eine geeignete Konzentration des nichtionischen Detergens` Brij 58 (Serva), eingesetzt nach folgender Vorschrift (z.B. in: [36] [90]): Stroma wurde mit der 2,5-fachen Menge Vorextraktionspuffer (10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 1% (w/v) Brij 58) vermischt. Diese Mischung wurde 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Membranen durch Zentrifugation (25 min bei 20 000 Upm; Zentrifuge: Sorvall Superspeed RC2-B; Rotor: Sorvall SS-34) vom Extrakt getrennt. Eine Überprüfung der Tauglichkeit dieser Vorextraktionsvorschrift⁶² lieferte allerdings einen negativen Befund: Es stellte sich heraus, daß damit nur verschwindende Mengen an Glykophorin aus der Membran gelöst wurden, selbst nach Erhöhung der Detergenskonzentration. Da davon auszugehen ist, daß die früheren Befunde korrekt waren, legt die Überprüfung den Schluß nahe, daß sich das Detergenspräparat in der Zwischenzeit verändert hat, möglicherweise durch eine Umstellung im Herstellungsverfahren.

Damit mußte ein neues Vorextraktionsprotokoll erstellt werden. Hierfür wurden verschiedene Detergenzien getestet, indem sie mit variierender Konzentration anstelle von Brij 58 in das alte Protokoll eingefügt und die resultierenden Extrakte analysiert wurden (mittels Neuraminsäuretest wurde die Glykophorinkonzentration bestimmt [165], via Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm die Bande 3-Konzentration abgeschätzt [31]). Auf diese Weise sollte eine Bedingung gefunden werden, unter der ein Großteil des Glykophorins solubilisiert wird, während genügend Bande 3 in der Membran verbleibt, so daß die anschließende Hauptextraktion eine ausreichende Bande 3-Konzentration liefert.

⁶¹ Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Aufnahme des Stromas in 2% SDS.

⁶² Durchgeführt von Sven Meyburg, Institut für Biophysik, JWG-Universität Frankfurt am Main.

Folgende Detergenzien wurden getestet:

- Pentadecafluorooctansäure
- Polyoxyethylen 20 Isohexadecylether ($C_{16}E_{20}$)
- Thesit ($C_{12}E_9$)

Die Untersuchung von Pentadecafluorooctansäure⁶³ ergab, daß dieses Detergens nicht in der Lage ist, mehr als 40% der in der Membran enthaltenen Neuraminsäure zu extrahieren: Pentadecafluorooctansäure-Konzentrationen, die für zufriedenstellende Glykophorin-Ausbeuten nötig wären, konnten mangels Löslichkeit nicht eingestellt werden (zwischen 4°C und Raumtemperatur).

Erste Untersuchungen von $C_{16}E_{20}$ ⁶⁴ lieferten ein umgekehrtes Bild: Die Ausbeute an Glykophorin war über dem gesamten gewählten $C_{16}E_{20}$ -Konzentrationsbereich sehr hoch, es wurde allerdings auch viel weiteres Protein extrahiert. Dies war nicht das gewünschte Resultat, dennoch könnte eine weitere Untersuchung, im unteren Konzentrationsbereich bis ca. 0,4% (w/v) $C_{16}E_{20}$ lohnend sein.

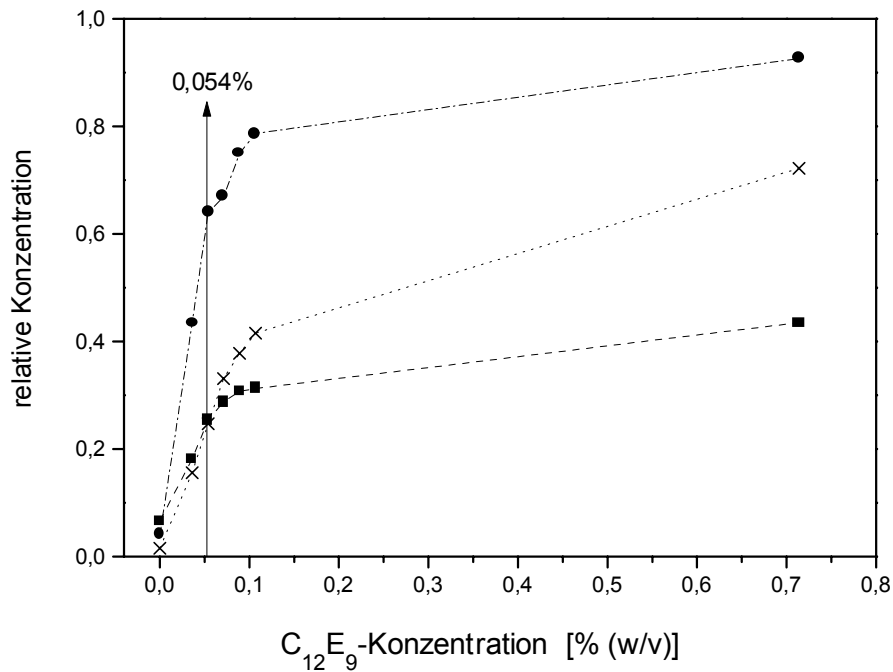
Mit $C_{12}E_9$ konnte eine zufriedenstellende Extraktionsbedingung gefunden werden, wie aus *Abbildung 7.1* deutlich wird: Sie zeigt in Abhängigkeit von der auf die gesamte Suspension (Stroma + Puffer) bezogenen $C_{12}E_9$ -Konzentration erstens die Neuraminsäurekonzentration des Extraktes relativ zu derjenigen der gesamten Probe (Membran + Extrakt), damit de facto die relative Glykophorinkonzentration; zweitens die Absorption des Extraktes bei 280 nm relativ zur Absorption der gesamten Probe (die Membranen wurden mittels 2% SDS aufgelöst), wodurch ein ungefähres Maß für die relative Bande 3-Konzentration gegeben ist; drittens den via Phosphattest [6] ermittelten relativen Lipidgehalt im Extrakt, ein weiteres Maß für die Solubilisations-„Kraft“. Der Pfeil in *Abbildung 7.1* deutet an, daß $C_{12}E_9$ bei einer Konzentration von 0,054% (w/v) zwischen 60% und 70% des gesamten Glykophorins aus der Membran zieht. Dies ist ausreichend, angesichts dessen, daß erstens Glykophorin verglichen mit Bande 3 in geringer Menge in der Membran vorliegt, zweitens mit der Ionenaustauscherchromatographie ein weiterer Schritt, Bande 3 und Glykophorin zu trennen, folgt und drittens Glykophorin bei 280 nm, der wichtigsten Wellenlänge bei den hier durchgeführten Bande 3-Untersuchungen, nur schwach absorbiert. Andererseits extrahieren 0,054% $C_{12}E_9$ offenbar eine nicht unerhebliche Menge an Bande 3, bedenkt man, daß der folgende Schritt, die Haupt-

⁶³ Durchgeführt von Christos Tziatzios, Institut für Biophysik, JWG-Universität Frankfurt am Main.

⁶⁴ Durchgeführt von Christos Tziatzios.

extraktion, das Protein wegen seiner Rolle bei der Membran-Membranskelett-Bindung nicht vollständig erfaßt. Dieser Nachteil macht sich aber, wie sich gezeigt hat, in der Praxis kaum bemerkbar: Die nach einer Vorextraktion mit 0,054% $C_{12}E_9$ erhaltenen Präparations-ergebnisse waren hinsichtlich der Ausbeute zufriedenstellend; sie enthielten erfahrungsgemäß mehr als 50% der ausbeutbaren Bande 3. Diese Größenordnung wird bestätigt durch einen Blick auf *Abbildung 7.1* und *Abbildung 7.2*. Letztere zeigt die SDS-PA-Gelelektrophorese der Extrakte sowie der Gesamtprobe (identische Volumina für alle aufgetragenen Proben); dabei sind die in der Vorextraktion solubilisierten und mit Silberfärbung detektierbaren Proteine, im wesentlichen Spektrin und Bande 3, in der dritten Spur zu sehen.

Mit $C_{12}E_9$, in entsprechend hoher Konzentration ein bewährtes Solubilisationsmittel für Bande 3, ist eine besonders schonende Vorextraktion gewährleistet, vorausgesetzt, das Detergens ist frei von Peroxiden, die als Oxidationsmittel Proteine schädigen können. Um diese Voraussetzung zu erfüllen, wurde zum einen mit „Thesit“ ein $C_{12}E_9$ -Präparat mit vom Hersteller garantierter Peroxidfreiheit eingesetzt. Zum anderen wurde, um Peroxid-Neubildung zu vermeiden oder zumindest zu reduzieren, das Detergens vor Licht, Erwärmung und insbesondere vor Sauerstoff geschützt.



Relative Neuraminsäurekonzentration (---●---); relative Absorption bei 280 nm (--■--); relative Phosphatkonzentration (···x···) im Erythrozytenmembran-Extrakt in Abhängigkeit von der $C_{12}E_9$ -Konzentration. Neuraminsäurekonzentration und Phosphatkonzentration sind bezogen auf die entsprechende Gesamtkonzentration in der Membransuspension vor der Zentrifugation, das Analoge gilt für die Absorption.

$C_{12}E_9$ lag zunächst in folgendem Puffer vor: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA. Die durch Zugabe von einer Volumeneinheit Stroma zu 2,5 Volumeneinheiten dieses Puffers sich ergebenden $C_{12}E_9$ -Endkonzentrationen (0%; 0,036%; 0,054%; 0,071%; 0,089%; 0,107%; 0,714%) sind hier aufgetragen.

Der Pfeil kennzeichnet die $C_{12}E_9$ -Endkonzentration des neuerstellten Vorextraktionsschrittes.

Abbildung 7.1

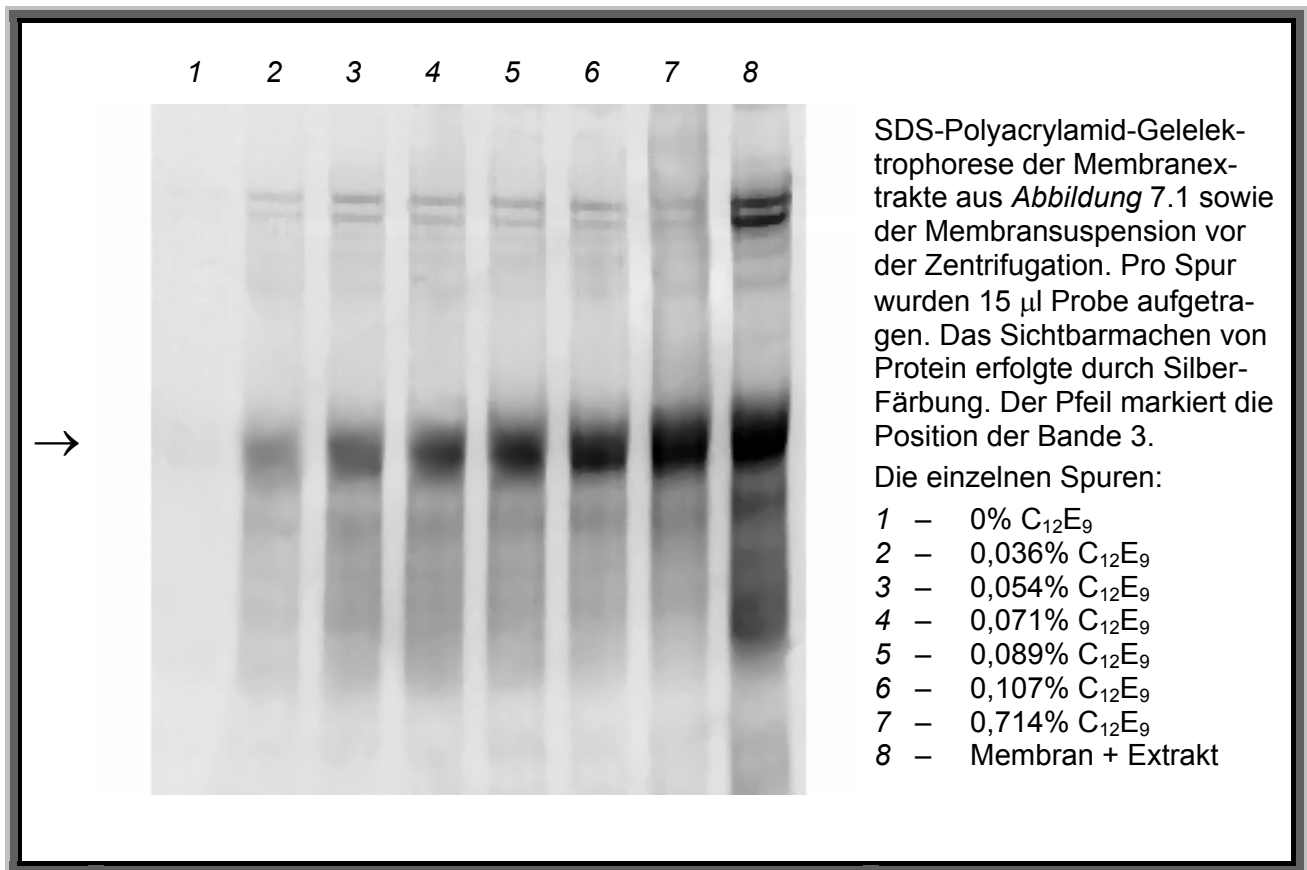


Abbildung 7.2

Die Vorextraktion wurde nun wie folgt durchgeführt:

10 ml Stroma wurden mit 25 ml des folgenden Puffers vermischt:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

50 mM NaCl

0,5 mM EDTA

0,075% (w/v) $C_{12}E_9$

Die Mischung wurde 20 min auf Eis inkubiert und anschließend 25 min bei 20 000 Upm zentrifugiert (Sorvall SS-34). Der Extrakt wurde verworfen.

7.2.3 Hauptextraktion

Zur Solubilisierung von Bande 3 wurde das aus der Vorextraktion resultierende Pellet vorsichtig in 25 ml des folgenden Puffers suspendiert:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
50 mM NaCl
0,5 mM EDTA
0,2 mM DTT
0,05% (w/v) DOC ⁶⁵
1% (w/v) C₁₂E₉ **oder** 0,7% (w/v) rTX-100
Densifier (gegebenenfalls)

Die Suspension wurde 30-40 min auf Eis inkubiert. Die anschließende Zentrifugation bei 20 000 Upm (Sorvall SS-34) dauerte, abhängig von der Densifierzugabe, d.h. von der Viskosität des Puffers, 1-2 h. Die Überstände – der Hauptextrakt – wurden gesammelt.

7.2.4 Ionenaustauscherchromatographie

Zur Aufreinigung des Extraktes wurde er einer Anionenaustauscherchromatographie unterzogen, deren Durchführung im Vergleich zu der in der Arbeitsgruppe üblichen etwas modifiziert wurde. Im einzelnen:

2,5 g des Austauschermaterials „Servacel“ (DEAE 23-SH-Cellulose von Serva) wurde im „Säulenpuffer“ aufgeschlämmt und zum Quellen 30-60 min unter gelegentlichem Aufschütteln stehengelassen. Diese Prozedur ersetzte die bis dato durchgeführte Vorbereitung des Austauschermaterials (abwechselnde Behandlung mit 0,25 M NaOH und 0,25 M HCl, zwischenzeitliches und abschließendes Spülen mit Wasser, Aufnahme in Säulenpuffer, gegebenenfalls Lagerung bei 4°C über Nacht), und damit eine für das Material tendenziell „strapaziosere“ Vorgehensweise, die im Vergleich zur neuen, einfacheren Prozedur keine Verbesserung des Präparats zur Folge hatte (Daten nicht gezeigt).⁶⁶ Das gequollene Material wurde in eine Chromatographiesäule mit 1,6 cm Innendurchmesser gepackt und mit ca. 150 ml des Säulenpuffers äquilibriert, der sich wie folgt zusammensetzte:

⁶⁵ Desoxycholsäure (Serva), zur Vermeidung von Aggregation der Bande 3.

⁶⁶ Zur Bedeutung des Ionenaustauschers für die Qualität der Bande 3 s. [10].

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

50 mM NaCl

0,5 mM EDTA

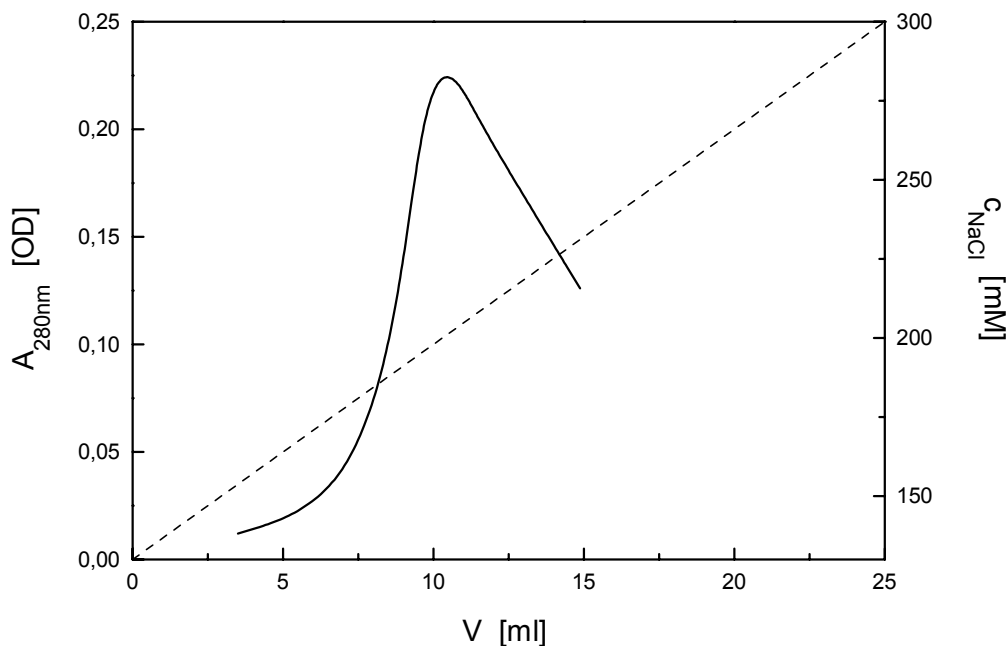
0,2 mM DTT

0,3% (w/v) Detergens (C₁₂E₉ **oder** rTX-100)

Densifier (gegebenenfalls)

Der Hauptextrakt wurde auf die Säule gegeben (Flußrate 100-140 ml/h; in diesem Bereich lag die Flußrate während der gesamten Chromatographie). Diese wurde anschließend mit 50 ml des Säulenpuffers gespült (insbesondere zum Entfernen von Lipiden). Es folgte die Elution von am Ionenaustauscher gebundenen Hauptextraktbestandteilen mittels Steigerung der Ionenstärke des Säulenpuffers (durch entsprechende Zugabe von NaCl): Eine Vorelution mit 50 ml 130 mM NaCl zur Entfernung von u.a. Glykophorin und Lipid und die Hauptelution mit einem linearen NaCl-Konzentrationsgradienten (12,5 ml 130 mM NaCl; 12,5 ml 300 mM NaCl), die im Maximum des – photometrisch ausgemessenen – Elutionsprofils (bei ungefähr 200 mM NaCl; s. *Abbildung 7.3*) praktisch reine Bande 3 lieferte (s.u.).

Verglichen mit dem früher praktizierten Stufengradienten ist der lineare Gradient zwar aufwendiger und liefert ein Eluat mit niedrigerer Proteinkonzentration, er verbessert aber die Reinigung und sorgt dafür, daß Bande 3 bei niedrigerer Salzkonzentration aus der Säule gewaschen wird. Letzteres ist insofern von Interesse, als generell mit zunehmender Ionenstärke die Gefahr der Denaturierung von Proteinen steigt. Dies gilt insbesondere für solubilisierter Bande 3 und ist das wesentliche Motiv für den folgenden Schritt.



Elutionsprofil der Anionenaustauscherchromatographie:

Gegen das Elutionsvolumen der Hauptelution sind die Proteinabsorption und die NaCl-Konzentration des Eluats aufgetragen. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm und einer Schichtdicke von 1 cm aufgenommen (Referenz: Säulenpuffer). Das Maximum liegt bei ca. 200 mM NaCl.

Abbildung 7.3

7.2.5 Gelfiltration

Unmittelbar im Anschluß an die Reinigung wurde mit der daraus gewonnenen Bande 3 auf einer kurzen vorgepackten Säule, Sephadex G-25 (PD 10), eine Gelfiltration durchgeführt, wobei die Säule mit dem Puffer äquilibriert war, in dem die Bande 3 untersucht werden sollte (in der Regel mit dem Säulenpuffer der Ionenaustauscherchromatographie). Die Gelfiltration leistete damit zum einen eine Reduzierung des NaCl-Gehalts, zum anderen bot sie die Gelegenheit zu gewissen Modifikationen der Bande 3-Umgebung. Darüber hinaus konnte man durch entsprechendes Schneiden des Elutionsprofils in gewissen Grenzen die Bande 3-Konzentration im endgültigen Präparat beeinflussen.

7.2.6 Qualitätstests

Das endgültige Präparat wurde auf seine Qualität hin überprüft mittels:

a) Absorptionsspektrophotometrie:

Diese Messung liefert nicht nur den Proteingehalt (nach [31] gilt für die Konzentration nicht aggregierter Bande 3, wenn man als Referenz den entsprechenden Puffer verwendet: $c_{(\text{Bande 3})} \approx 10 \mu\text{M} \cdot A$, wobei A die in OD gemessene Absorption bei 280 nm und bei 1 cm Schichtdicke bezeichnet), sondern ermöglicht eine erste, schnelle Einschätzung des Bande 3-Zustands. Denn aggregiertes Protein zeigt aufgrund von Lichtstreuung eine scheinbare Absorption im kurzwelligeren UV-Bereich und macht sich damit als erhöhtes Verhältnis zwischen der optischen Dichte bei 250 nm und derjenigen bei 280 nm bemerkbar. Zur Verdeutlichung sind in *Abbildung 7.4* die Absorptionsspektren eines „guten“ und eines „schlechten“ Präparats übereinandergelegt.

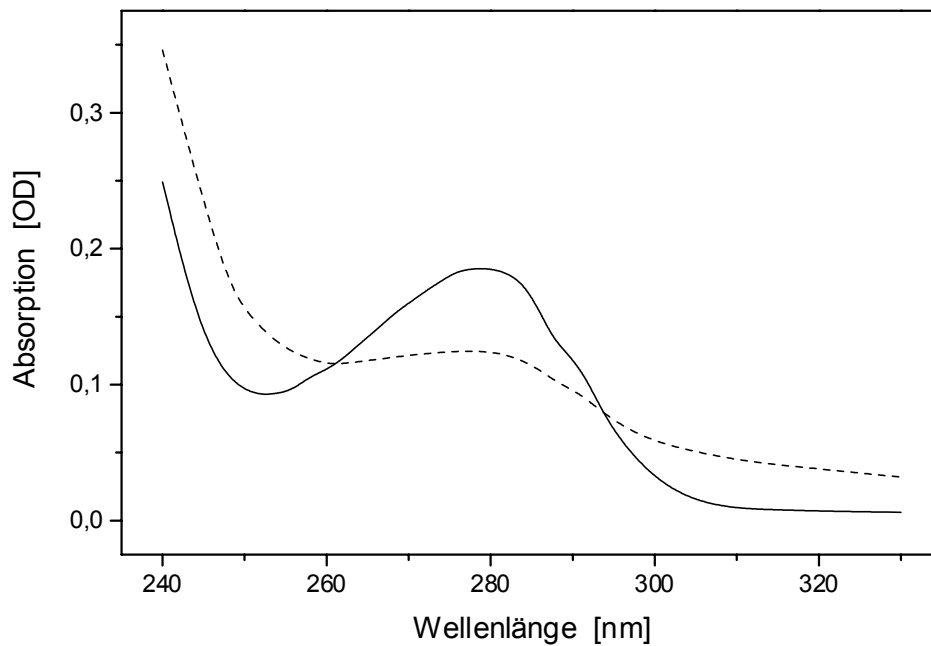
b) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Diese Methode (nach [38]) gibt – qualitativ – Auskunft über die Reinheit des Präparats. *Abbildung 7.5* zufolge ist die für Ultrazentrifuguntersuchungen erforderliche hohe Reinheit (ca. 95%) im Falle des Bande 3-Präparats offenbar gegeben: Das mit der sehr empfindlichen Silberfärbung [137] entwickelte Gel zeigt nur Spuren von Verunreinigung (der Schatten oberhalb der Hauptbande rührt vermutlich von irreversibel dimerisierter Bande 3 her, derjenige unterhalb dürfte zum größten Teil aus Bande 4.2 bestehen).

c) Anionentransportmessung:

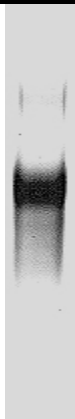
Durch Transport- bzw. Fluxmessung konnte gezeigt werden, daß die Funktion und damit die Nativität des Proteins während der Präparation erhalten blieb. Dazu wurde die solubilierte und aufgereinigte Bande 3 in Lipidvesikel aus Ei-PC⁶⁷ rekonstituiert. Die Lipid-Protein-Vesikel wurden anschließend aufgereinigt, von Cl^- getrennt und ankonzentriert. Schließlich wurden sie mit radioaktiv markiertem Sulfat beladen, um den Sulfat-Flux aus den Vesikeln zu messen zu können (bei 37°C). Hierbei wurde der mit gehemmter Anionentransportfunktion (Inhibitor: H₂DIDS) stattfindende Efflux ebenso bestimmt wie derjenige mit ungehemmter, da erst deren Differenz den Bande 3-spezifischen Efflux liefert. Das Beispiel in *Abbildung 7.6* zeigt diese Differenz sehr deutlich. Standard-Protokoll: [109] bzw. [110]

⁶⁷ Phosphatidylcholin aus Hühnerei



Absorptionsspektren von Bande 3-Präparaten in 10 mM Tris/HCl (pH 8); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,2 mM DTT; 0,3% (w/v) rTX-100; 9,7% (w/v) Saccharose. Durchgezogene Linie: intakte Bande 3; gestrichelte Linie: Präparat mit hohem Anteil an aggregierter Bande 3. Meßgerät: Hitachi U-2000; Referenz: Puffer; Schichtdicke: 1 cm. Die Spektren wurden bei 4°C aufgenommen.

Abbildung 7.4



SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eines typischen Bande 3-Präparats nach vollendeter Präparation. Die Sichtbarmachung von Protein erfolgte durch Silber-Färbung.

Abbildung 7.5

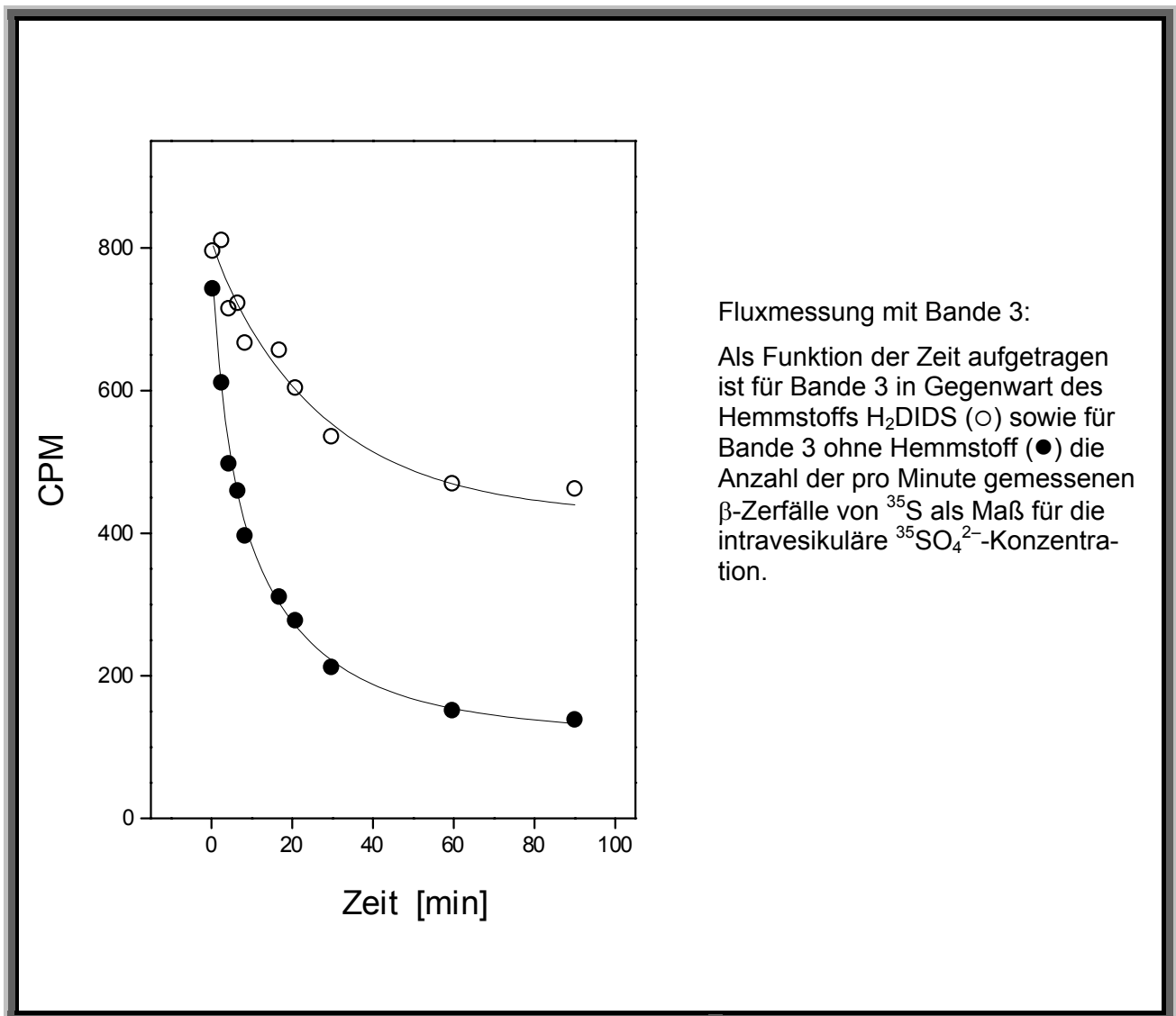


Abbildung 7.6

7.3 Molmasse und partialspezifisches Volumen der Bande 3

Die wesentlichen Bande 3-spezifischen Größen, die in die Ultrazentrifugenuntersuchung des Proteins eingehen, sind die Molmasse des Protomers und das partialspezifische Volumen.

7.3.1 Molmasse

Die Protomeren-Molmasse des Bande 3-Proteins (M) setzt sich zusammen aus der Molmasse des Polypeptids (M^{PP}) und der Molmasse der an das Polypeptid gebundenen Oligosaccharidketten. Erstere ergibt sich aus der bekannten Aminosäuresequenz: $M^{\text{PP}} = 101\,791 \text{ Da}$ [78]. Der Oligosaccharid-Teil ist heterogen: Die Bande 3 enthält zwischen 5% und 8% Kohlen-

hydrat [157]. Für die Bestimmung von M wird ein Kohlenhydratanteil von 6% verwendet (Die Heterogenität äußert sich in einer entsprechenden Massenverteilung, die im Elektrophoresegel deutlich wird [32]; vgl z.B. Bande 1 und Bande 3 in *Abbildung 7.2*).

Zusammengenommen ergibt sich eine mittlere Protomeren-Molmasse von $M = 108 \text{ kDa}$.

7.3.2 Partialspezifisches Volumen

Für das partialspezifische Volumen des Bande 3-Proteins einschließlich Kohlenhydrat gilt nach [31]: $\bar{v} = (0,74 \pm 0,02) \text{ ml/g}$. Zum Vergleich sei das nach Cohn/ Edsall (für in Wasser gelöstes Protein bei 25°C) errechnete \bar{v} der Aminosäurekette, korrigiert um den Beitrag der Oligosaccharide, angegeben: $\bar{v}_c = 0,743 \text{ ml/g}$.⁶⁸ Nach einer entsprechend [34] durchgeführten Korrektur dieses Werts auf 4°C erhält man $\bar{v}_c^{4^\circ\text{C}} = 0,734 \text{ ml/g}$. Damit stimmt das kalkulierte partialspezifische Volumen mit dem gemessenen im Rahmen des Fehlers überein.

Da in einem intakten Präparat eine Bande 3-Selbstassoziation nicht mit Proteindenaturierung verbunden ist, kann \bar{v} als unabhängig vom oligomeren Zustand des Proteins angenommen werden (vgl. [34]).

7.4 Die Untersuchung des Bande 3-Proteins in C_{12}E_9 -Lösungen

In zahlreichen Bande 3-Studien erfolgte die Solubilisierung und Aufreinigung des Proteins in C_{12}E_9 -Lösungen. Laut durchgesetzter Meinung erhält dieses Detergens den Zustand der Bande 3 beim Übergang von der Membran in wässrige Lösungen (vgl. [106]). Gesichert ist, daß C_{12}E_9 die Fähigkeit des Proteins zum Anionentransport konserviert und damit zumindest weitgehend den nativen Zustand [71]. Von daher ist es wahrscheinlich, wenn auch nicht sicher, daß auch die Quartärstruktur bzw. eine etwaige Selbstassoziation der Bande 3 von C_{12}E_9 konserviert wird – zumindest qualitativ. So gewährt C_{12}E_9 einen Zugang zum Bande 3-Selbstassoziationsverhalten: über Ultrazentrifugenuntersuchungen, welche solubilisiertes Protein voraussetzen.

Die Präparation der Bande 3 erfolgte (inklusive Vorextraktion) in Gegenwart von C_{12}E_9 .

7.4.1 Untersuchung ohne Dichtekompensation

Das Bande 3-Protein wurde ohne dichtesteigernden Zusatz präpariert. Im fertigen Präparat („Präparat 1/1“) betrug seine Konzentration ca. 0,17 mg/ml. Es lag vor in:

⁶⁸ Berechnet mit SEDNTERP

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

50 mM NaCl

0,5 mM EDTA

0,3% (w/v) C₁₂E₉

Ein Teil des Präparats wurde mit diesem Puffer verdünnt (auf 0,06 mg/ml, 0,03 mg/ml bzw. 0,02 mg/ml). Das Protein wurde in vier Ultrazentrifugenzellen – entsprechend den vier verschiedenen Konzentrationen – einem Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment unterzogen (Füllvolumen des Probensektors: 180 µl): Mit einer Rotordrehzahl von 40 000 Upm und bei einer Temperatur von 4°C wurden ca. 30 Scans pro Zelle in unmittelbarer Abfolge durchgeführt (1 „average“).

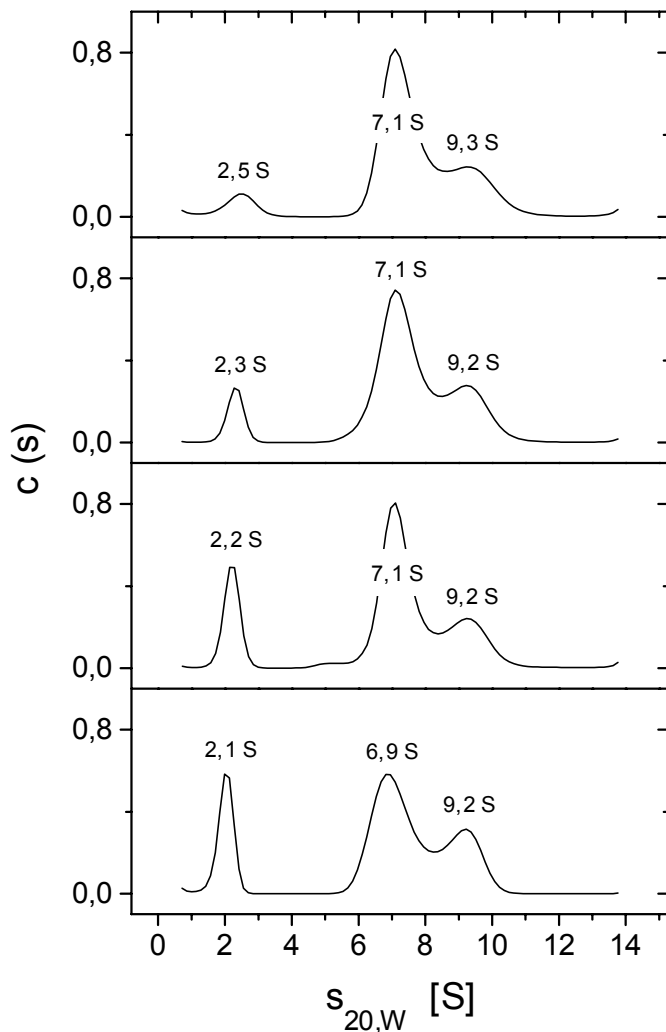
Als Meßwellenlänge wurde mit 230 nm die Wellenlänge gewählt, bei der die Intensität der Xenon-Blitzlampe maximal ist, um angesichts sehr niedriger Bande 3-Konzentration das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren. Der Nachteil von Licht dieser Wellenlänge besteht darin, daß es von vielen organischen Substanzen absorbiert wird. Somit tragen Zusätze oder Verunreinigungen zu einer deutlichen Erhöhung der Basisabsorption bei. Zur Minimierung dieses Problems wurde das im Eluat der Ionenaustauscherchromatographie enthaltene DTT im Gelfiltrationsschritt entfernt.

Die Auswertung des Sedimentationsverlaufs beruhte auf folgenden Vorkenntnissen bzw. Annahmen: Die Messung der Dichte bzw. der dynamischen Viskosität des Puffers ergab $\rho = 1,004$ g/ml bzw. $\eta = 1,61$ cPoise. Zur Abschätzung des partialspezifischen Volumens des Protein-Detergens-Komplexes wurde dieses als unabhängig von der oligomeren Form der Bande 3 angenommen und mit dem partialspezifischen Volumen des Bande 3-Dimer-C₁₂E₉-Komplexes, nach [90] $\bar{v} = 0,82$ ml/g, identifiziert. Wie sich herausstellen wird, ist im Rahmen dieser Untersuchung die dimere Form der Bande 3 die mengenmäßig dominierende, wodurch die \bar{v} -Abschätzung gestützt wird. Überdies ist die c(s)-Analyse sehr stabil gegenüber fehlerhaften \bar{v} -Werten [121] [127]. Dies gilt auch für den relativen Reibungskoeffizienten f/f_0 , der im Falle einer heterogenen Substanz – ebenso wie der \bar{v} -Wert – als Mittelwert in die c(s)-Analyse eingeht. Die Bestimmung des gemittelten relativen Reibungskoeffizienten erfolgte via Anpassungsrechnung, durchgeführt anhand einer Reihe von Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten mit Bande 3 unter Verwendung des genannten \bar{v} -Werts und der entsprechenden Werte für ρ und η des jeweiligen Puffers. Diese f/f_0 -Bestimmung ist mit großer Unsicherheit behaftet, zumal dabei fehlerhafte Vorgaben, z.B. für \bar{v} , tendenziell ausgeglichen werden (wodurch umgekehrt die Analyse verbessert wird). Dennoch dürfte das Ergebnis – ein

relativer Reibungskoeffizient von ca. 1,7 ergab im Mittel die besten Anpassungen – realistisch sein, wie sich zeigen wird.

Die $c(s)$ -Verteilungen wurden auf Basis eines Konfidenzniveaus („F-ratio“) von 0,95 berechnet, d.h. die Verteilungen zeigen nur Komponenten, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% vorhanden sind. Die resultierenden Verteilungen, auf $\int c(s)ds = 1$ normiert, sowie die Residuen der zugehörigen Anpassungen in der Bitmapdarstellung sind in *Abbildung 7.7* zu sehen. Aus den Verteilungen geht hervor, daß die Bande 3-Lösungen neben einer dominierenden sedimentierenden Komponente, die einen Sedimentationskoeffizienten von $s_{20,W} \approx 7$ S besitzt, (mindestens) zwei weitere sedimentierende Komponenten enthalten. Signifikant sind eine Komponente, deren $s_{20,W}$ -Wert um 9,2 liegt, und eine offenbar kleinere mit $s_{20,W} \approx 2,3$ S. Letztere nimmt mit abnehmender Proteinkonzentration relativ zu; ihr Anteil an der Gesamtkonzentration (ermittelt durch Integration des 2,3 S-Peaks) in Abhängigkeit von der zu Beginn der Zentrifugation gegebenen Bande 3-Konzentration ist in *Tabelle 7-1* aufgeführt (hier wird der Anteil an der Gesamtabsorption dem Anteil an der Gesamt- (Massen-) Konzentration gleichgesetzt; diese Voraussetzung trifft zu, wenn alle sedimentierenden Bestandteile den selben Extinktionskoeffizienten besitzen).

A



B



Bande 3-Konzentrationsreihe:

A: s-Wert-Verteilungen aus einem Sedimentationsgeschwindigkeitslauf mit 0,17 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,03 mg/ml und 0,02 mg/ml Bande 3 (von oben nach unten). Die Verteilungen sind auf Fläche = 1 normiert und mit den s-Werten der Maxima beschriftet.

B: Residuen der Anpassungen in der Bitmapdarstellung.

Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,3% (w/v) $C_{12}E_9$. Experimentelle Bedingungen: Rotorgeschwindigkeit: 40000 Upm; Rotortemperatur: 4°C; Meßwellenlänge: 230 nm. Auswertung: partielspezifisches Volumen des Protein-Detergens-Komplexes: 0,82 ml/g; Pufferdichte: 1,004 g/ml; Pufferviskosität: 1,61 cPoise; relativer Reibungskoeffizient: 1,7; Konfidenzniveau: 0,95.

Abbildung 7.7

Tabelle 7-1

Bande 3-Konzentration	Anteil der 2,3 S-Komponente
0,17 mg/ml	8%
0,06 mg/ml	10%
0,03 mg/ml	19%
0,02 mg/ml	21%

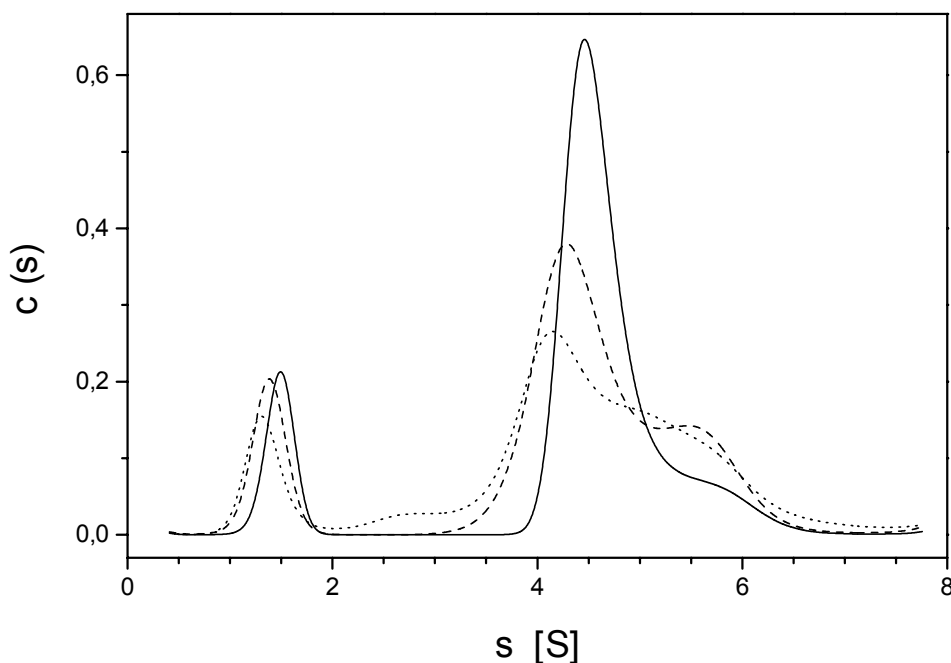
Die niedrige Qualität der zur hohen Anfangskonzentration gehörenden Residuen insbesondere im meniskusnahen Bereich dürfte, zumindest teilweise, der Differenz zwischen dem von der Zentrifugensoftware ausgewiesenen Zeitpunkt t eines Scans und dem tatsächlichen Zeitpunkt der Messung an einer Radialposition r innerhalb dieses Scans geschuldet sein. Eine aus dieser Differenz hervorgehende Systematik in den Residuen verschwindet mit abnehmender Anfangskonzentration tendentiell im Rauschen.

Ein weiterer, allerdings geringer systematischer Fehler kann sich daraus ergeben, daß alle vier $c(s)$ -Verteilungen auf dem selben f/f_0 -Wert beruhen: Aus einer konzentrationsabhängigen Zusammensetzung des Präparats folgte eine Konzentrationsabhängigkeit des durchschnittlichen f/f_0 -Werts, Unterschiede in den f/f_0 -Werten der einzelnen Komponenten vorausgesetzt. Wie sich fehlerhafte Angaben des relativen Reibungskoeffizienten auf die $c(s)$ -Verteilung prinzipiell auswirken, soll am Beispiel von 0,06 mg/ml Bande 3 vorgeführt werden: Der Sedimentationsverlauf dieser Probe wurde wie in *Abbildung 7.7* mit $f/f_0 = 1,7$ angepaßt, außerdem mit zwei deutlich suboptimalen Werten, $f/f_0 = 1,2$ und $f/f_0 = 3,0$ (die Residuen der mit den suboptimalen Werten vollzogenen Anpassungen wiesen deutliche Systematiken auf). Die resultierenden $c(s)$ -Verteilungen sind in *Abbildung 7.8* zu sehen (ohne Normierung und ohne s -Umrechnung auf Standardbedingungen). Darin zeigt sich, daß eine Unterschätzung von f/f_0 den Hauptpeak schärft und auf Kosten des rechten Peaks zu höheren s -Werten verschiebt; hier geht tendenziell Information verloren. Umgekehrt: Eine Überschätzung von f/f_0 verbreitert die Peaks im rechten Teil des Spektrums, begünstigt den rechten „Peak“ und läßt eine zusätzliche Komponente zwischen Hauptpeak und linkem Peak erscheinen. Bemerkenswerterweise werden Position und Schärfe des linken Peaks von f/f_0 -Schwankungen kaum beeinflußt.

Bis zu dieser Stelle wird bei der Interpretation des Bande 3-Verhaltens vorausgesetzt, daß die sedimentierenden Bestandteile nicht bzw. mit gemessen an der Untersuchungsdauer niedriger Reaktionsgeschwindigkeit interagieren. Ist die Voraussetzung korrekt, liefert die $c(s)$ -Analyse

zuverlässige Ergebnisse, wie oben bemerkt, selbst bei fehlerhaften Vorgaben. Anders verhält es sich im Falle schneller oder intermediärer Assoziationsgleichgewichte, die in der $c(s)$ -Analyse zu Peaks mit fehlerhafter Position bzw. artifizieller Verbreiterung führen. Zur Verdeutlichung: Ein idealer, rauschfreier Datensatz, der die Sedimentation (und die entsprechende Diffusion) zweier Komponenten unterschiedlichen s -Werts wiedergibt, stellt sich im $c(s)$ -Plot als Deltafunktionen über den beiden s -Werten dar, sofern die Komponenten unabhängig voneinander sind. Findet Wechselwirkung statt, erhält man ein Massenkontinuum zwischen den beiden s -Werten, wobei bei langsamer Wechselwirkung zwei Maxima mit bezogen auf die Deltafunktionen verringertem Abstand erscheinen, während sich ein schnelles Gleichgewicht als breiter „Peak“ zwischen den beiden s -Werten äußert.

Das konzentrationsabhängige Auftreten der langsamen Komponente weist darauf hin, daß diese an einem Assoziationsgleichgewicht beteiligt ist. Welche Bestandteile dieses Gleichgewicht gegebenenfalls einschließt, ist den Ergebnissen des Experiments allerdings ebensowenig zu entnehmen wie die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung.



s -Wert-Verteilungen, aus den $A(r)$ -Daten von 0,06 mg/ml Bande 3 mit unterschiedlichen relativen Reibungskoeffizienten berechnet (alles weitere wie in *Abbildung 7.7*): $f/f_0 = 1,2$ (—); $f/f_0 = 1,7$ (----); $f/f_0 = 3,0$ (.....).

Abbildung 7.8

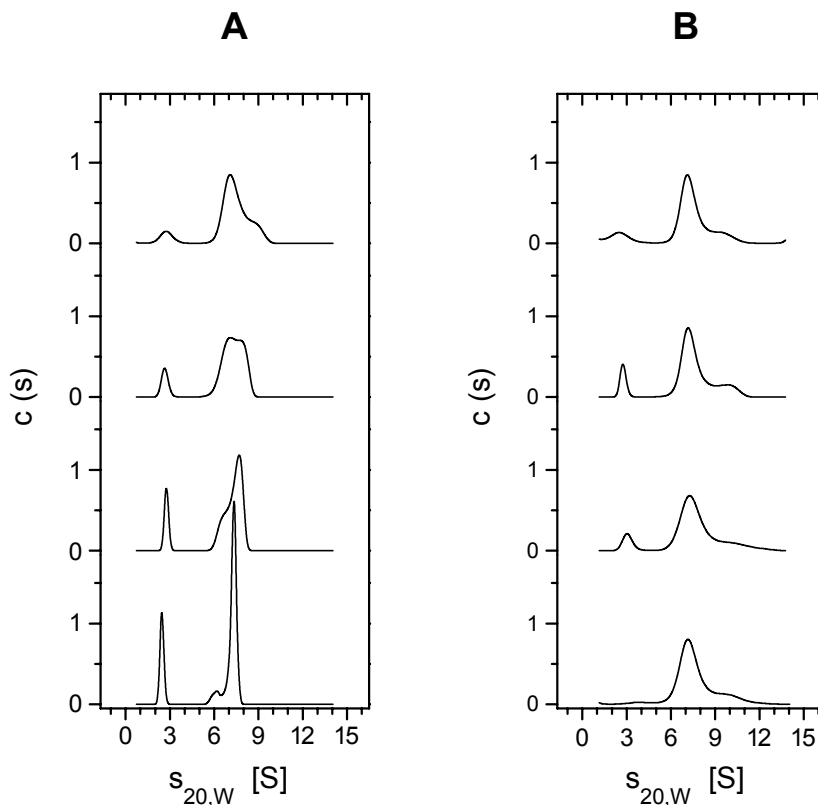
Zur Überprüfung der bisherigen Ergebnisse wurden Bande 3-Präparation, Experiment und Auswertung ohne Variation wiederholt, mit der Ergänzung, daß das Präparat mehrfach, d.h. zu verschiedenen Zeiten, untersucht wurde. Die Präparation lieferte 0,12 mg/ml Bande 3 („Präparat 1/2“). Ein Teil des Präparats wurde verdünnt: auf 0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml bzw 0,01 mg/ml. Somit standen vier Lösungen unterschiedlicher Proteinkonzentration zur Verfügung, denen jeweils 180 µl für einen ersten Sedimentationsgeschwindigkeitslauf, gestartet ca. 2 h nach Ende der Präparation, entnommen wurden. Der Rest wurde bei 4°C aufbewahrt. Etwa 44 h nach Fertigstellung des Präparats wurden daraus für einen zweiten Lauf erneut jeweils 180 µl abgezweigt. In einem dritten Lauf nach ca. 140-stündiger Lagerung bei 4°C wurde nur die konzentrierte Lösung – ebenfalls 180 µl – untersucht. Die (normierten) $c(s)$ -Profile des Proteins aus den ersten beiden Läufen sind in *Abbildung 7.9* zu sehen (*A*: Lauf 1, *B*: Lauf 2; von oben nach unten abnehmende Bande 3-Konzentration). *Abbildung 7.10* zeigt die – ebenfalls normierten – $c(s)$ -Verteilungen des konzentrierten Proteins nach 2-, 44- und 140-stündiger Lagerung.

Das Ergebnis des ersten Laufs ist zum Teil vertraut: Es gibt eine Komponente zwischen 2 S und 3 S, deren Anteil an der GesamtabSORPTION/-konzentration mit sinkender Proteinkonzentration steigt. Diese Abhängigkeit verläuft auch quantitativ beinahe identisch mit derjenigen aus dem ersten Experiment, wie sich durch Integration des linken Peaks der jeweiligen $c(s)$ -Verteilung ergab (s. *Tabelle 7-2*). Damit bestätigt sich der obige Hinweis auf ein Assoziationsgleichgewicht. Im Unterschied zum ersten Experiment deuten die $c(s)$ -Verteilungen auch im jeweiligen mittleren und rechten Teil auf ein Assoziations-/ Dissoziationsverhalten hin: Zum einen verschiebt sich die rechte Flanke mit abnehmender Proteinkonzentration systematisch nach links; zum anderen ist das komplizierte Verhalten der Hauptkomponente einschließlich Umgebung nicht erklärbar, wenn man von nicht-interagierenden Lösungsbestandteilen ausgeht. Darüberhinaus waren die Anpassungen auch im Falle der niedrigen Konzentrationen von schlechter Qualität: Die (nicht abgebildeten) Residuen zeigten jeweils einen sehr deutlichen systematischen Verlauf, was Modellfehler indiziert.

Die $c(s)$ -Analyse des zweiten Laufs offenbarte bemerkenswerte Unterschiede zum ersten: Erstens erscheint der Charakter des Hauptpeaks einschließlich seiner Umgebung weniger komplex, zweitens verschwindet der konzentrationsabhängige Drift der rechten Flanke. Die $c(s)$ -Profile des zweiten Laufs (sowie die nicht gezeigten Residuen) sind den mit *Präparat 1/1*

gewonnenen sehr ähnlich, abgesehen vom linken Peak, der – drittens – bei niedriger Proteinkonzentration verschwindet (s. auch *Tabelle 7-2*).

Bei der hohen Proteinkonzentration ist die langsame Komponente dagegen äußerst stabil: Wie *Abbildung 7.10* zeigt, ist sie selbst nach 140 h noch vorhanden. Der *Abbildung* ist außerdem zu entnehmen, daß nach langer Lagerdauer die beiden schnellen Bestandteile scheinbar ineinander übergehen.



Bande 3-Konzentrationsreihe zu verschiedenen Zeiten:

s-Wert-Verteilungen aus zwei Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen mit 0,12 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml und 0,01 mg/ml Bande 3 (von oben nach unten). Die Verteilungen sind auf Fläche = 1 normiert.

A: s-Lauf 1; Start: 2 h nach Ende der Präparation.

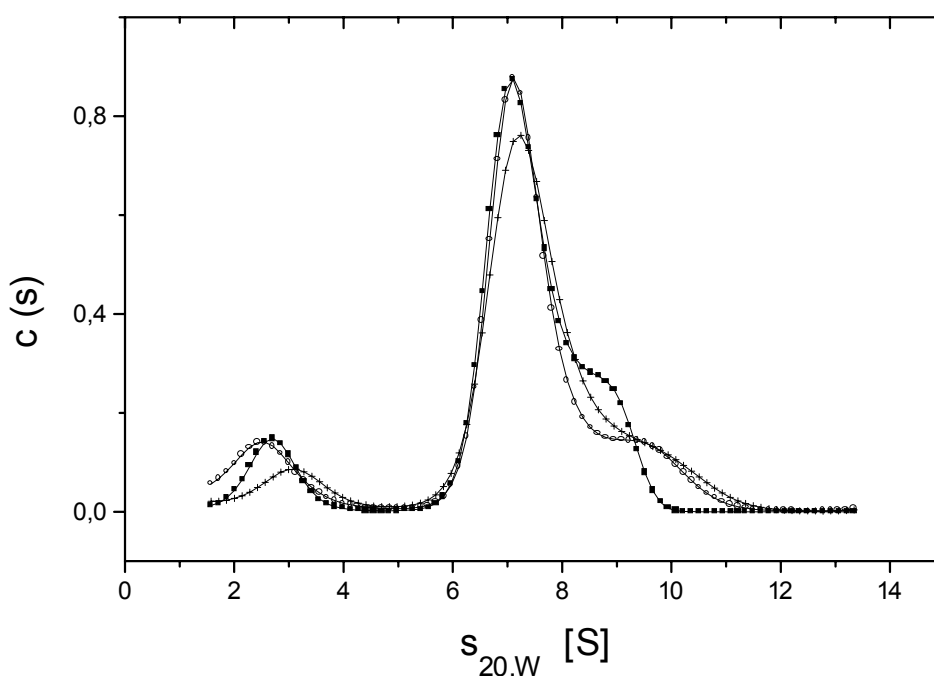
B: s-Lauf 2; Start: 44 h nach Ende der Präparation.

Puffer, Experiment und Auswertung: s. *Abbildung 7.7*; Lagertemperatur: 4°C.

Abbildung 7.9

Tabelle 7-2

Bande 3-Konzentration	Anteil der langsamen Komponente nach	
	2 h	44 h
0,12 mg/ml	10%	11%
0,04 mg/ml	13%	13%
0,02 mg/ml	17%	11%
0,01 mg/ml	23%	2%



Bande 3-Zustand in Abhängigkeit von der Zeit:

s-Wert-Verteilungen aus drei Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen mit 0,12 mg/ml Bande 3. Die Verteilungen sind auf Fläche = 1 normiert.

Beginn der Läufe: s-Lauf 1 (—■—): 2 h, s-Lauf 2 (—○—): 44 h, s-Lauf 3 (—+—): 140 h nach Ende der Präparation.

Puffer, Experiment und Auswertung: s. *Abbildung 7.7*; Lagertemperatur: 4°C.

Abbildung 7.10

Zwischenbilanz:

Von den möglichen oligomeren Formen der Bande 3 werden in der Literatur neben dem Dimer die monomere und die tetramere Form häufiger genannt. Dabei ist das Vorhandensein des Dimers unzweifelhaft; meist wird es als Hauptform, wenn nicht als einzige Form besprochen. Darüberhinaus ist der $s_{20,W}$ -Wert des Bande 3-Dimers in $C_{12}E_9$ als $(6,8 \pm 0,2)$ S in der Literatur verankert [90]. Damit dürfte es sich bei der in den obigen Experimenten beobachteten Hauptkomponente um das Dimer handeln. Berechnet man den relativen Reibungskoeffizienten⁶⁹ dieser Komponente (sei $s_{20,W} = 7,1$ S) unter dieser Voraussetzung (Molmasse des Bande 3-Dimer- $C_{12}E_9$ -Komplexes mit 0,64 g $C_{12}E_9$ pro 1 g Bande 3 [90]: 354 kDa), so erhält man mit $f/f_0 = 1,75$ einen realistischen Wert für ein langgestrecktes Protein: Dieser Wert entspricht einem starren prolaten Partikel mit einem Achsenverhältnis von etwa 16:1 (vgl. [21] [22]). Nimmt man nun an, der im ersten Experiment deutlich hervortretende Peak bei $s_{20,W} = 9,2$ S gehöre zu tetramerer Bande 3, so errechnet sich ein relativer Reibungskoeffizient von 2,15 (das Bande 3- $C_{12}E_9$ -Verhältnis sei unabhängig vom oligomeren Zustand). Daraus folgt ein Prolat-Achsenverhältnis von etwa 27:1 – ein zu hoher Wert für ein Tetramer, sollten dessen Protomere parallel assoziieren (dies entspräche den Verhältnissen in der Membran); dagegen ein realistischer Wert im Falle einer seriellen Anordnung zweier Dimere (skizziert in *Abbildung 7.11*; ein Pfeil entspricht einem Dimeren). Deutet man umgekehrt die 9,2 S-Komponente als Dimer, ergibt sich für f/f_0 bzw. für das Prolat-Achsenverhältnis ein zu niedriger Wert (1,35 bzw. 7:1), es sei denn, man zieht die Möglichkeit eines in seiner Form drastisch veränderten, denaturierten Proteins in Betracht. Sei schließlich die 9,2 S-Komponente trimere Bande 3: Mit $f/f_0 = 1,77$ bzw. einem Prolat-Achsenverhältnis von 17:1 scheint dies die naheliegendste Deutung (im Widerspruch zum Umstand, daß das Trimer in der Bande 3-Literatur keine Rolle spielt).

Während Komponenten im rechten Teil des $c(s)$ -Spektrums nicht eindeutig auf ein bestimmtes Bande 3-Oligomer verweisen, folgt aus der Identifizierung der 7,1 S-Komponente mit dem Dimer, daß die langsame Komponente (2,3 S) dem Bande 3-Monomer zuzuordnen ist – wenn man annimmt, daß der 2,3 S-Peak auf intakter Bande 3 beruht. Ist diese Annahme korrekt, so folgt für das monomere Protein ein relativer Reibungskoeffizient von 3,4 bzw. ein Prolat-Achsenverhältnis von ca. 62:1. Dieses Verhältnis scheint zu hoch, angesichts dessen, daß ein Dimer durch parallele Assoziation zweier Protomere gebildet wird (s. z.B. [164]). Allerdings

⁶⁹ Berechnet mit SEDFIT

sei darauf hingewiesen, daß das Achsenverhältnis unter der sicher nicht zutreffenden Voraussetzung eines starren Partikels ermittelt wurde – und da monomere und dimere Bande 3 mit Sicherheit von unterschiedlicher Flexibilität sind, ist es sehr wohl möglich, daß die 2,3 S-Komponente dem Monomer entspricht.

Abschließend sei bemerkt, daß die hier durchgeführten Berechnungen und Überlegungen – da es sich nur um eine Annäherung handelt – davon ausgehen, daß die betrachteten sedimentierenden Komponenten nicht bzw. langsam wechselwirken.

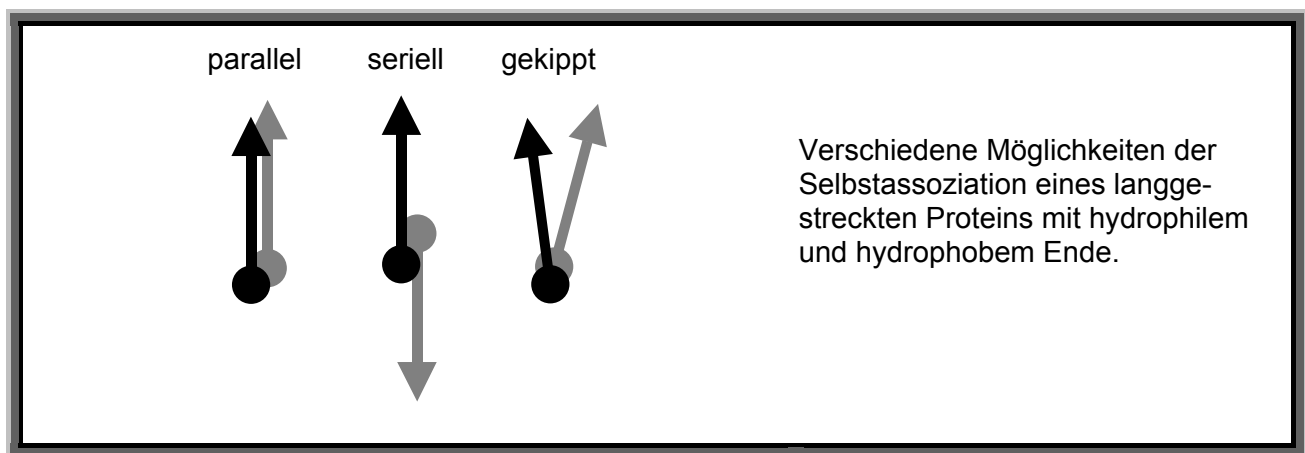


Abbildung 7.11

Die ohne Kompensation der Detergendsichte durchgeführten Untersuchungen werfen einige Fragen auf:

- Beschreiben die beobachteten $c(s)$ -Verteilungen reine Protein-Verteilungen, oder spielen – mit Blick auf die langsame Komponente – freie Detergensemizellen eine Rolle?
- Hält die Identifizierung der Hauptkomponente mit dem Bande 3-Dimer einer Überprüfung stand?
- Gibt es einen Beweis für die Existenz trimerer Bande 3? Bzw.: Welche/s Oligomer/e bildet/ bilden die schnelle/n Komponente/n?

Die Beantwortung dieser Fragen erfordert die Durchführung von sowohl Sedimentationsgeschwindigkeits- als auch Sedimentationsgleichgewichtsexperimenten unter Kompensationsbedingungen.

7.4.2 Dichtekompensation mit D₂O

Die Präparation der Bande 3 erfolgte bis einschließlich Hauptextraktion ohne Densifier. Auf der Ionenaustauschersäule wurde auf den D₂O-haltigen Puffer gewechselt. Das endgültige Präparat („Präparat 2“) bestand aus ca. 0,2 mg/ml Bande 3, vorliegend in folgendem Puffer:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

50 mM NaCl

0,5 mM EDTA

0,2 mM DTT

0,3% (w/v) C₁₂E₉

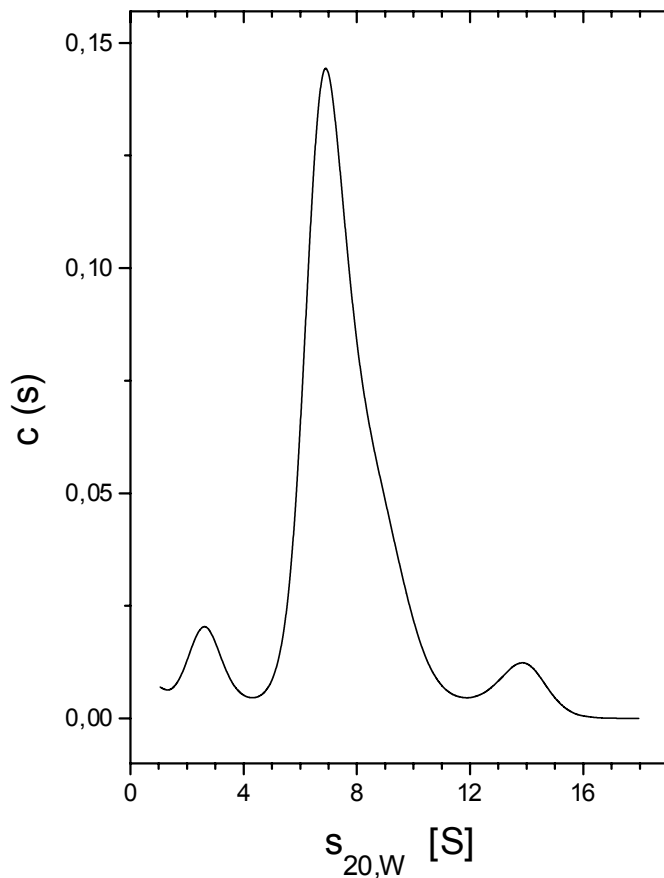
46/54 (v/v) D₂O/H₂O

Es wurde unmittelbar nach Fertigstellung einer Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse unterzogen. Im Anschluß daran wurde es im Sedimentationsgleichgewicht untersucht.

Der s-Lauf wurde bei einer Rotordrehzahl von 40 000 Upm und bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Das Füllvolumen des Probensektors betrug ca. 200 µl. Die A(r)-Daten wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgenommen. Die Auswertung des Sedimentationsverlaufs beruhte wie oben auf $\bar{v} = 0,82$ ml/g, dem partialspezifischen Volumen des Protein-Detergens-Komplexes, und auf einem mittleren relativen Reibungskoeffizienten der sedimentierenden Bestandteile von 1,7. Für Dichte und dynamische Viskosität des Puffers wurden die bekannten Werte eingesetzt: $\rho = 1,050$ g/ml und $\eta = 1,81$ cPoise.

Die A(r)-Daten dieses Experiments waren, verglichen mit den anderen Bande 3-s-Läufen, mit hohem Rauschen behaftet, weswegen für die Berechnung der c(s)-Verteilung das Konfidenzniveau auf 0,68 gesetzt wurde. Dadurch ist die Zuverlässigkeit der in der Verteilung enthaltenen Informationen entsprechend reduziert.

In *Abbildung 7.12* ist die c(s)-Verteilung samt Residuen gezeigt. Letztere, als Bitmap dargestellt, lassen keine Systematik erkennen, was jedoch – zumindest teilweise – auf das relativ niedrige Signal-Rausch-Verhältnis im Datensatz zurückzuführen ist. Der Verteilung läßt sich entnehmen, daß auch unter der Bedingung der Dichtekompensation erstens eine langsame Komponente vorhanden ist – hier mit einem $s_{20,w}$ -Wert von ca. 2,6 S – und zweitens die Hauptkomponente im Bereich von 7 S liegt – das Maximum liegt bei $s_{20,w} = 6,9$ S. Drittens deutet sich auch in *Abbildung 7.12* eine Komponente um 9 S an. Neu ist hingegen das Auftreten einer Komponente mit $s_{20,w} = 13,9$ S.



s-Wert-Verteilung (oben) und zugehörige Residuen (unten, als Bit-map) aus einem Lauf mit 0,2 mg/ml Bande 3 unter der Bedingung der Dichtekompensation.

Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,2 mM DTT; 0,3% (w/v) C₁₂E₉; 46/54 (v/v) D₂O/H₂O. Experimentelle Bedingungen: Rotorgeschwindigkeit: 40000 Upm; Rotortemperatur: 4°C; Meßwellenlänge: 280 nm. Auswertung: partialspezifisches Volumen des Protein-Detergens-Komplexes: 0,82 ml/g; Pufferdichte: 1,050 g/ml; Pufferviskosität: 1,81 cPoise; relativer Reibungskoeffizient: 1,7; Konfidenzniveau: 0,68.

Abbildung 7.12

Der Gleichgewichtslauf wurde bei einer Rotordrehzahl von 12 000 Upm und bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt (Füllvolumen der Probenkammer: ca. 135 µl). Das Gleichgewicht wurde nach ca. 50 h erreicht (ohne Overspeed). Die Gleichgewichtsprofile wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgenommen (40 „averages“) und – zunächst – mit Basislinie und den Molmassen des Monomers, Dimers und Tetramers der deuterierten Bande 3 angepaßt. Dabei wurde der H-D-Austausch am Protein wie folgt berücksichtigt: Es wurde ein Deuterierungsgrad von 70% angenommen, was dem gemessenen Deuterierungsgrad der

Cytochrom *c*-Oxidase entspricht. Bei 46% D₂O führt dies zu $k = 1,005$. Das Produkt aus k und der Molmasse des undeuterten Proteins ergibt schließlich die Molmasse des deuterierten Proteins [35]. Dem Einfluß des H-D-Austauschs auf das partialspezifische Volumen des Proteins wurde gemäß $\bar{v}_d = \bar{v}/k$ [35] Rechnung getragen (\bar{v}_d , \bar{v} : partialspezifisches Volumen der deuterierten bzw. undeuterten Bande 3). Damit erhält man mit $\bar{v} = 0,74 \text{ ml/g}$ $\bar{v}_d = 0,736 \text{ ml/g}$, bzw., mit $\rho = 1,050 \text{ g/ml}$, $\bar{v}_d \rho = 0,773$. Dieser Wert floß in die Auswertung ein.

In *Abbildung 7.13* ist ein gemessenes Gleichgewichtsprofil samt Auswertung dargestellt. Die Residuen zeigen, daß das Profil durch das Modell „Monomer/ Dimer/ Tetramer“ vollständig erklärt werden kann. In der Tat konnte der Fit durch Hinzunahme einer weiteren Komponente wie Trimer, Hexamer oder Oktamer nicht (signifikant) verbessert werden. Umgekehrt zeigen die $\sigma(A)$ -Funktionen, daß alle Komponenten des Modells „Monomer/ Dimer/ Tetramer“ für eine Anpassung von hoher Qualität vonnöten sind. Im Einzelnen ergaben sich:

(15 ± 3)% Monomer,

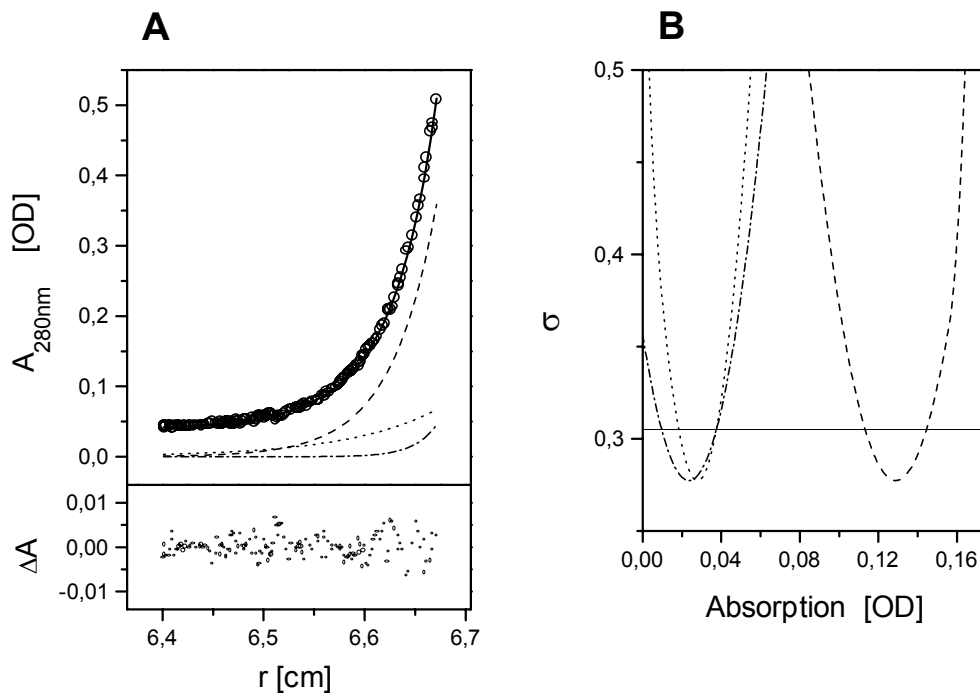
(72 ± 5)% Dimer und

(13 ± 4)% Tetramer,

jeweils bezogen auf die Gesamtabsorption des Proteins.

Der Vergleich des Gleichgewichtslaufs mit dem vorgeschalteten s-Lauf zeigt erstens, daß die mit $s_{20,w} \approx 7 \text{ S}$ sedimentierende Komponente erwartungsgemäß dimerer Bande 3 entspricht. Zweitens korreliert die langsame Komponente mit dem Monomer und – drittens – die 13,9 S-Komponente mit dem Tetramer. Einen Hinweis auf die Natur der breiten Flanke um 9 S liefert der Vergleich nur im negativen Sinne: Um trimere Bande 3 handelt es sich wohl nicht.

Man nehme nun an, die aus dem Vergleich der beiden Läufe folgende Identifizierung der 13,9 S-Komponente mit tetramerer Bande 3 sei korrekt. Dann erhält man für diese Komponente einen relativen Reibungskoeffizienten von 1,42 (Molmasse des Bande 3-Tetramer-C₁₂E₉-Komplexes: 708 kDa; s.o.). Dies entspricht einem starren prolaten Partikel mit einem Achsenverhältnis von etwa 9:1. Im Sinne der Überlegungen aus dem vorangegangenen Kapitel ist dieses Ergebnis mit der Annahme verträglich, daß es sich bei diesem Tetramer um **parallel** assoziierende Dimere handelt.



Sedimentationsgleichgewichtsanalyse mit 0,2 mg/ml Bande 3 unter der Bedingung der Dichtekompensation:

A: Oben: Gemessenes Gleichgewichtsprofil (O) mit optimaler Anpassung (—), zusammengesetzt aus Basislinie, Monomer (.....), Dimer (----) und Tetramer (-----). Unten: Residuen der Anpassung.

B: Fehlerquadratsumme als Funktion der Absorption (bzw. Konzentration) von Monomer, Dimer und Tetramer; horizontale Linie: 10% Erhöhung von σ (Konfidenzniveau).

Experimentelle Bedingungen: Rotorgeschwindigkeit: 12000 Upm; Rotortemperatur: 4°C; Meßwellenlänge: 280 nm. Puffer: s. *Abbildung 7.12*.

Abbildung 7.13

Es stellt sich nun die Frage, ob bzw. inwieweit sich die in diesem Kapitel gewonnenen Erkenntnisse reproduzieren lassen. Dabei sollen von Experiment zu Experiment verschiedene Gesichtspunkte betont werden. Darüberhinaus sollen mit der Verwendung von Saccharose und Glycerin diejenigen neuen Methoden der Dichtekompensation zum Einsatz kommen, denen – hier als Nebenwirkung – eine Stabilisierung von Proteinstrukturen zugesprochen wird.

7.4.3 Dichtekompensation mit Saccharose

Die Präparation der Bande 3 erfolgte ab Beginn der Hauptextraktion in Gegenwart von 6,4% (w/v) Saccharose. Das endgültige Präparat („*Präparat 3*“) bestand aus 0,3 mg/ml Bande 3 in folgendem Puffer:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

50 mM NaCl

0,5 mM EDTA

0,2 mM DTT

0,3% (w/v) C₁₂E₉

6,4% (w/v) Saccharose

Mit *Präparat 3* wurden zwei identische Gleichgewichtsläufe in deutlichem zeitlichen Abstand durchgeführt, um die Stabilität der Bande 3 in C₁₂E₉-Lösung zu testen. Der erste Lauf begann unmittelbar, der zweite etwa 90 h nach Abschluß der Präparation. Um im ersten Lauf das Ergebnis eines möglichst frischen Präparats zu erhalten, wurde mit reduziertem Füllvolumen zentrifugiert (ca. 80 µl pro Probenkammer). Dadurch verkürzte sich die Gleichgewichtseinstellungsdauer auf etwa 20 h. Da sich mit abnehmendem Füllvolumen die bezüglich des Informationsgehalts der Gleichgewichtsprofile optimale Rotordrehzahl erhöht, wurde der Lauf bei (durchgehend) 14 000 Upm durchgeführt (Rotortemperatur: 4°C).

Um den mit der Verringerung des Füllvolumens einhergehenden Informationsverlust auszugleichen, wurden pro Lauf sechs Probenkammern mit *Präparat 3* bestückt. Die sechs Gleichgewichtsprofile wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgezeichnet (40 „averages“) und mit freier Basis sowie den Molmassen für Bande 3-Monomer, -Dimer und -Tetramer angepaßt (mit $\rho = 1,028 \text{ g/ml}$: $\bar{v}\rho = 0,761$). Die resultierenden Anteile der einzelnen Oligomere an der gesamten Proteinabsorption sind in *Tabelle 7-3* zusammengefaßt (Die Zeitangabe bezieht sich nicht auf den Beginn des jeweiligen Laufs, sondern benennt die Zeitspanne zwischen Ende der Präparation und Gleichgewichtseinstellung). Ein Beispiel eines gemessenen Gleichgewichtsprofils aus dem ersten Lauf mit der optimalen Anpassung und den einzelnen Komponenten ist in *Abbildung 7.14A* zu sehen; die Residuen im unteren Teil der Abbildung zeigen die hohe Qualität der Anpassung.

Tabelle 7-3

	Zeit nach Ende der Präparation	Monomer [%]	Dimer [%]	Tetramer [%]
Lauf 1:	20 h	17 - 23	73 - 83	0 - 4
Lauf 2:	110 h	14 - 21	77 - 86	0 - 2

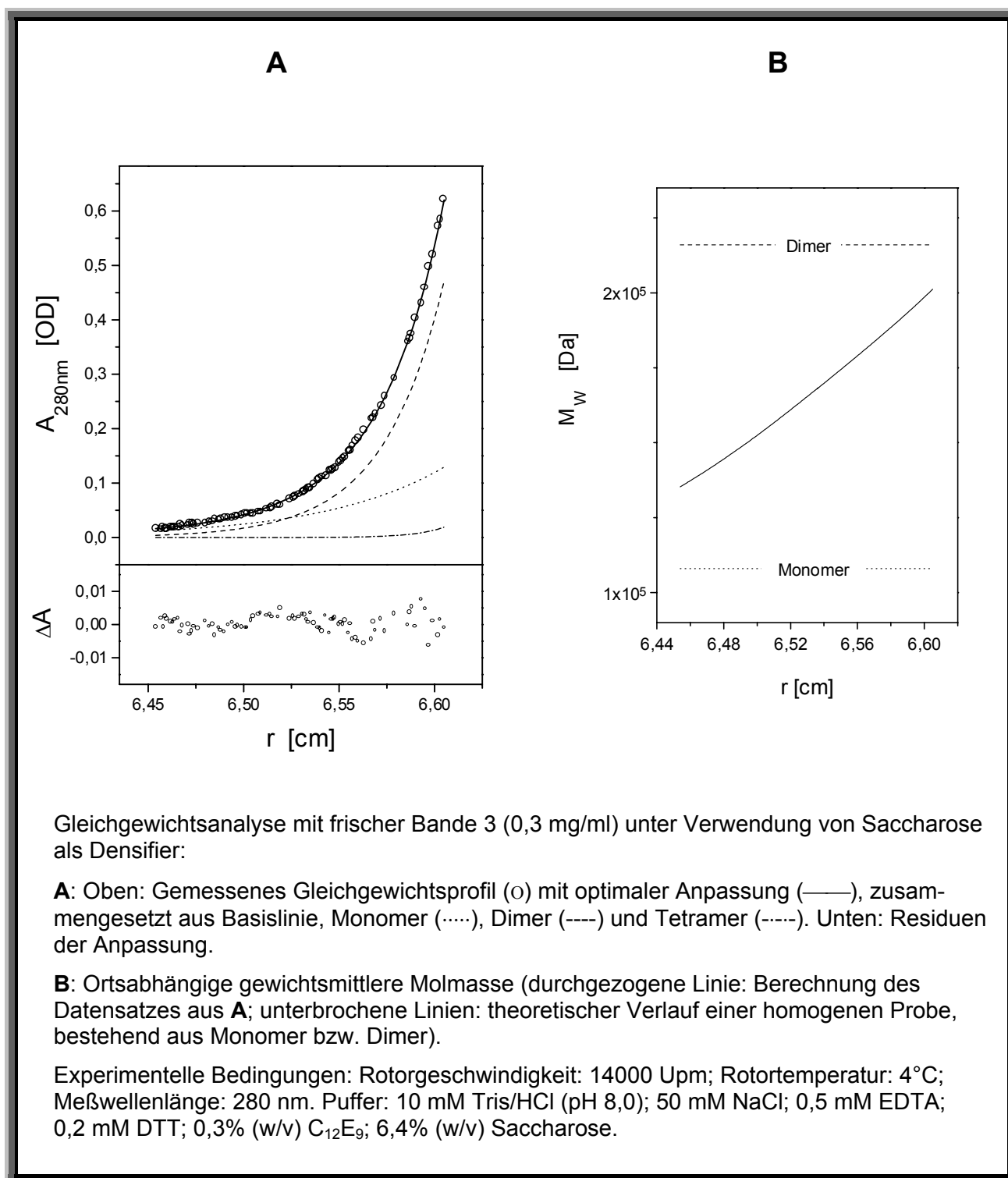


Abbildung 7.14

Der Tabelle zufolge besteht das Präparat sowohl in (relativ) frischem Zustand als auch nach einigen Tagen aus ca. 20% Monomer und 80% Dimer (das Monomer-Dimer-Verhältnis scheint sich im Laufe der Zeit etwas in Richtung Dimer zu verschieben). Abgesehen von der verschwindenden Tetramerenkonzentration, die auch in weiteren, hier nicht aufgeführten Experimenten mit Bande 3 in Gegenwart von $C_{12}E_9$ und Saccharose zu beobachten war, deckt sich dieses Verhalten mit demjenigen von *Präparat 1/2*, welches, wie gezeigt, für lange Zeit stabil war – im Hinblick auf die langsame Komponente zumindest in der ursprünglichen Konzentration, die mit der Proteinkonzentration in *Präparat 3* vergleichbar ist.

Um das Vorhandensein monomerer Bande 3 zu verdeutlichen, wurde das Gleichgewichtsprofil aus *Abbildung 7.14A* alternativ ausgewertet. Dazu wurde zu jeder Radialposition r die gewichtsmittlere Protein-Molmasse, M_w , berechnet. Der $M_w(r)$ -Plot, gezeigt in *Abbildung 7.14B*, verweist auf eine deutliche Inhomogenität unter Beteiligung der Molmassen des Monomers und des Dimers.

7.4.4 Dichtekompensation mit Glyzerin

In diesem Kapitel wird die Untersuchung von vier verschiedenen Bande 3-Präparaten dokumentiert. Die Präparation erfolgte in allen Fällen ab Beginn der Hauptextraktion in Gegenwart von 13,2% (w/v) Glyzerin; der Präparationsverlauf war in allen Fällen bis zum Abschluß des Gelfiltrationsschrittes im Prinzip identisch. An dieser Stelle lag das Bande 3-Protein in folgendem Puffer vor:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
50 mM NaCl
0,5 mM EDTA
0,2 mM DTT
0,3% (w/v) $C_{12}E_9$
13,2% (w/v) Glyzerin

Die Bande 3-Konzentrationen:

Präparat 4/1: 0,19 mg/ml

Präparat 4/2: 0,17 mg/ml

Präparat 4/3: 0,33 mg/ml

Präparat 4/4: 0,20 mg/ml

Die ersten drei Präparate wurden ausschließlich im Sedimentationsgleichgewicht untersucht. Sie wurden jeweils zweigeteilt, wobei ein Teil in obigem Puffer ohne Manipulation der Zentrifugalanalyse zugeführt wurde, während der zweite Teil vor der Zentrifugation einer Sonderbehandlung unterzogen wurde. So wurde im Vergleich zum „Standard“ der Einfluß von 2-Mercaptoethanol (ME)⁷⁰ untersucht (*Präparat 4/1*), außerdem die Wirkung gezielter „Fehlbehandlung“ wie Wärmeexposition (*Präparat 4/2*) oder Schütteln (*Präparat 4/3*). An *Präparat 4/4* wurde schließlich der Versuch unternommen, den Alterungsprozeß der Bande 3 aufzuzeichnen. Dazu wurde über einen großen Zeitraum hinweg eine Serie von s-Läufen durchgeführt, unterbrochen von einem Gleichgewichtslauf gegen Ende der Serie.

Die Experimente im einzelnen:

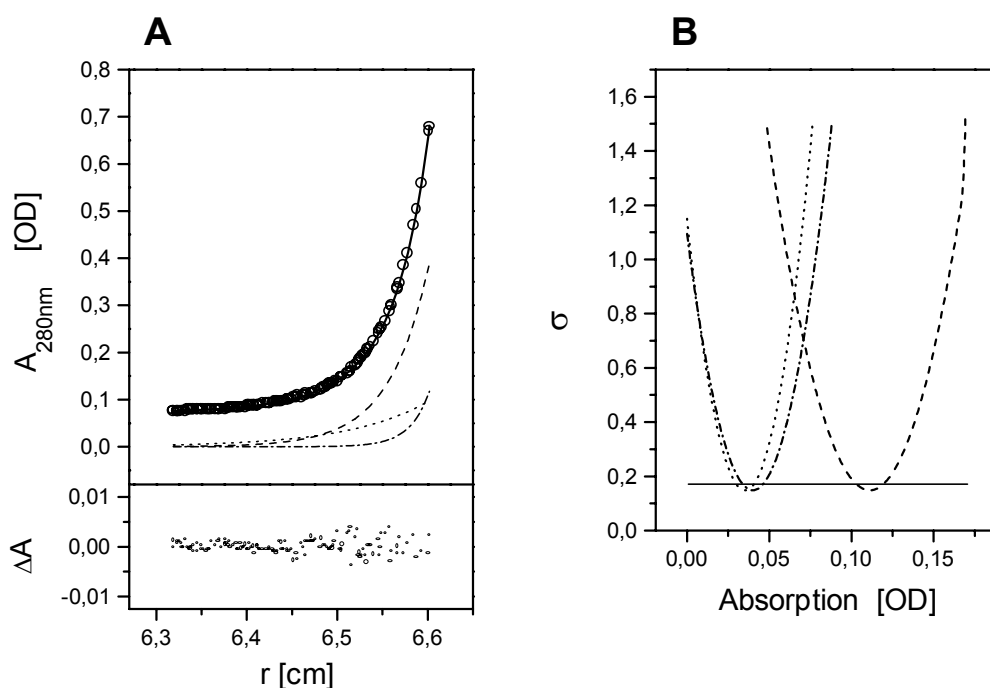
Präparat 4/1:

Das Präparat wurde zweigeteilt. Ein Teil wurde im Zustand nach Abschluß der Präparation belassen. Dem anderen Teil wurde unter vorsichtigem Rühren schrittweise 2-Mercaptoethanol zugeführt; die ME-Endkonzentration betrug 14 mM. Beide Teile wurden im Sedimentationsgleichgewicht untersucht (Rotorgeschwindigkeit: 12 000 Upm, kein Overspeed; Rortemperatur: 4°C; Füllvolumen der Probenkammer: ca. 135 µl). Das Gleichgewicht wurde nach ca. 60 h erreicht. Die Gleichgewichtsprofile wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgenommen (50 „averages“) und mit freier Basis sowie den Molmassen für Bande 3-Monomer, -Dimer und -Tetramer angepaßt (mit $\rho = 1,033 \text{ g/ml}$: $\bar{v}\rho = 0,764$). Die Resultate der Anpassungsrechnung sind in Form der Oligomer-Anteile an der Gesamtabsorption des Proteins in *Tabelle 7-4* aufgeführt.

⁷⁰ 2-Mercaptoethanol: SH-Reagens, welches wie DTT vor der Bildung von Disulfidbrücken schützt bzw. in hoher Konzentration bestehende Disulfidbrücken spaltet.

Tabelle 7-4

Bande 3	Monomer (Anteil in %)	Dimer (Anteil in %)	Tetramer (Anteil in %)
ohne ME	19 ± 3	60 ± 6	21 ± 4
mit ME	12 ± 6	70 ± 9	18 ± 8



Gleichgewichtsanalyse mit 0,19 mg/ml Bande 3 unter Verwendung von Glycerin als Densifier:

A: Oben: Gemessenes Gleichgewichtsprofil (o) mit optimaler Anpassung (—), gebildet aus Basislinie, Monomer (.....), Dimer (----) und Tetramer (-----). Unten: Residuen der Anpassung.

B: Fehlerquadratsumme als Funktion der Konzentration von Monomer, Dimer und Tetramer; horizontale Linie: Konfidenzniveau.

Experimentelle Bedingungen: Rotorgeschwindigkeit: 12000 Upm; Rotortemperatur: 4°C; Meßwellenlänge: 280 nm. Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,2 mM DTT; 0,3% (w/v) C₁₂E₉; 13,2% (w/v) Glycerin.

Abbildung 7.15

Der unveränderte Teil des Präparats enthält offenbar neben der Hauptkomponente, dem Dimer, einen beträchtlichen Teil Monomer und Tetramer. Die Zuverlässigkeit dieses Befundes ist in *Abbildung 7.15* zur Anschauung gebracht: Sie zeigt ein gemessenes Gleichgewichtsprofil mit der optimalen Anpassung einschließlich ihrer Bestandteile und ihrer Residuen, außerdem die $\sigma(A)$ -Funktionen von Monomer, Dimer und Tetramer. Der Vergleich von letzteren mit dem Konfidenzniveau setzt die Signifikanz auch der „Nebenkomponenten“ ins Bild. Den statistisch um „0“ verteilten Residuen ist die hohe Qualität der Anpassung zu entnehmen, womit sie darauf verweisen, daß für die Interpretation des $A(r)$ -Profils keine weiteren Komponenten nötig sind (z.B. trimere Bande 3).

Im ME-haltigen Teil des Präparats scheint der Tetramer- und insbesondere der Monomergehalt zugunsten des Dimers vermindert (auch hier war die Anpassung von hoher Qualität), durch die hohe Unsicherheit der Bande 3-Untersuchung in Gegenwart von ME ist dieser Schluß jedoch nicht sicher (die Erhöhung der Unsicherheit ist auf die von ME verursachte Erhöhung der Basislinie zurückzuführen: die Basisabsorption betrug etwa die Hälfte der Gesamtabsorption). Sicher ist lediglich, daß ME monomere Bande 3 unter den gegebenen Umständen nicht begünstigt. Angesichts der Eigenschaft von ME, Disulfidbrückenbildung zu verhindern, deutet dies immerhin darauf hin, daß der Zusammenbau/-halt eines Dimers unter den gegebenen Umständen nicht auf Disulfidbrücken angewiesen ist. Umgekehrt ist denkbar, daß ME – verwandt mit den für Proteine meist schädlichen Alkoholen – dem möglicherweise empfindlichen monomeren Zustand der Bande 3 nicht zuträglich ist.

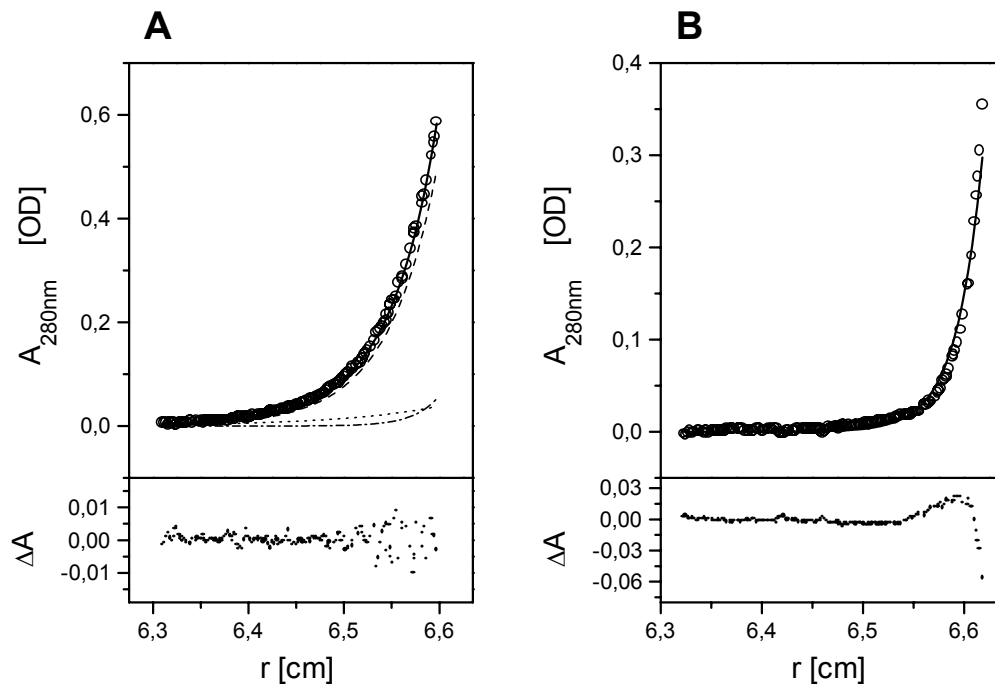
Präparat 4/2:

Das Präparat wurde zweigeteilt. Ein Teil wurde bei 4°C aufbewahrt, während der andere für 100 min bei 35°C inkubiert wurde. Beide Teile wurden anschließend einer Sedimentationsgleichgewichtsanalyse unterzogen (Rotorgeschwindigkeit: 11 000 Upm; Rotortemperatur: 4°C; Füllvolumen der Probenkammer: ca. 135 μ l). Die Gleichgewichtsprofile wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgenommen (60 „averages“). Sie wurden zunächst mit freier Basis sowie den Molmassen für Bande 3-Monomer, -Dimer und -Tetramer angepaßt ($\bar{v} \rho = 0,764$).

Ein Beispiel für ein gemessenes Gleichgewichtsprofil der **nicht erwärmten** Probe ist in *Abbildung 7.16A* zu sehen. Ebenfalls dargestellt ist die optimale Anpassung, derzufolge das Protein wie folgt zusammengesetzt ist:

8%	Monomer
82%	Dimer
10%	Tetramer

Die unsystematisch verteilten Residuen in *Abbildung 7.16A* deuten darauf hin, daß – wie bisher – das standardmäßig behandelte Bande 3-Präparat praktisch ausschließlich aus monomeren, dimeren und tetrameren Protein besteht. Im Unterschied dazu weisen die Residuen in *Abbildung 7.16B*, die sich aus der Anpassung eines Gleichgewichtsprofils der **erwärmten** Probe ergeben, eine sehr deutliche Systematik auf. Dem ist zu entnehmen, daß das der Anpassung zugrundeliegende Modell, Monomer, Dimer, Tetramer und freie Basislinie, in diesem Fall falsch ist. Offensichtlich fehlt dem Modell mindestens eine Komponente mit höherer Molmasse (es wurde ausschließlich Tetramer angepaßt). Deshalb wurde die Auswertung mit freier Basis, Monomer, Dimer und einer variablen Molmasse wiederholt. Das Ergebnis: Der experimentelle Datensatz ließ sich mit Dimer und einer Molmasse zwischen 800 kDa und 900 kDa, also im Molmassenereich oktameres Bande 3, mit guter Qualität anpassen (Monomergehalt: 0%; Dimergehalt: 20-25% von der Gesamtabsorption des Proteins). Demnach aggregiert das Protein in künstlicher, von Detergens gebildeter Umgebung durch Erwärmung auf etwa Körpertemperatur, bei der *in vivo* das Protein lange Zeit stabil ist; der monomere Zustand der Bande 3 wird durch den Wärmeeinfluß offenbar vollständig gelöscht (vgl. [155]).



Gleichgewichtsanalyse mit 0,17 mg/ml Bande 3 unter Verwendung von Glycerin als Densifier:

A oben: Gemessenes Gleichgewichtsprofil (o) von standardmäßig behandelter Bande 3 mit optimaler Anpassung (—), gebildet aus Basislinie, Monomer (.....), Dimer (----) und Tetramer (-----).

B oben: Gemessenes Gleichgewichtsprofil (o) von auf 35°C erwärmter Bande 3 mit der auf Basis des selben Modells wie in **A** bestmöglichen Anpassung (—).

A und **B** unten: Residuen der jeweiligen Anpassung.

Experimentelle Bedingungen: Rotorgeschwindigkeit: 11000 Upm; Rotortemperatur: 4°C; Meßwellenlänge: 280 nm. Puffer: s. *Abbildung 7.15*.

Abbildung 7.16

Präparat 4/3:

Das Präparat wurde zweigeteilt. Ein Teil wurde für 1,5 min (unter N₂) via Vortex geschüttelt (maximale Frequenz), während der andere Teil in Ruhe blieb. Beide Teile wurden anschließend in jeweils drei Probenkammern (Füllvolumen: ca. 135 µl) einer Sedimentationsgleichgewichtsanalyse unterzogen (Rotorgeschwindigkeit: 12 000 Upm; Rotortemperatur: 4°C). Die Gleichgewichtsprofile wurden bei 280 nm aufgenommen (50 „averages“) und mit freier Basis sowie den Molmassen für Bande 3-Monomer, -Dimer und -Tetramer angepaßt ($\bar{v} \rho = 0,764$). Die Auswertungsergebnisse zu den sechs Probenkammern sind in *Tabelle 7-5* zusammengefaßt (die Anteile sind bezogen auf die Gesamt-Proteinabsorption). Die Anpassungen waren in allen Fällen von hoher Qualität.

Tabelle 7-5

Bande 3	Monomer (Anteil in %)	Dimer (Anteil in %)	Tetramer (Anteil in %)
ohne Vortex-Behandlung	11 ± 2	84 ± 6	5 ± 5
mit Vortex-Behandlung	0 + 2	93 ± 5	7 ± 5

Die wichtigste aus *Tabelle 7-5* zu ziehende Erkenntnis dürfte sein, daß dem monomeren Zustand der Bande 3 „grobe“ Behandlung abträglich ist (in *Abbildung 7.17* an einem Beispiel dargestellt). Eine Bestimmung der durch Schütteln verursachten Vorgänge, die zum Verschwinden des Monomers führen, konnte allerdings nicht geleistet werden. Zu vermuten ist, daß Scherprozesse eine entscheidende Rolle spielen. Trotz Vortex-Behandlung unter N₂ kann auch ein Einfluß von (Rest-) O₂ nicht ausgeschlossen werden.

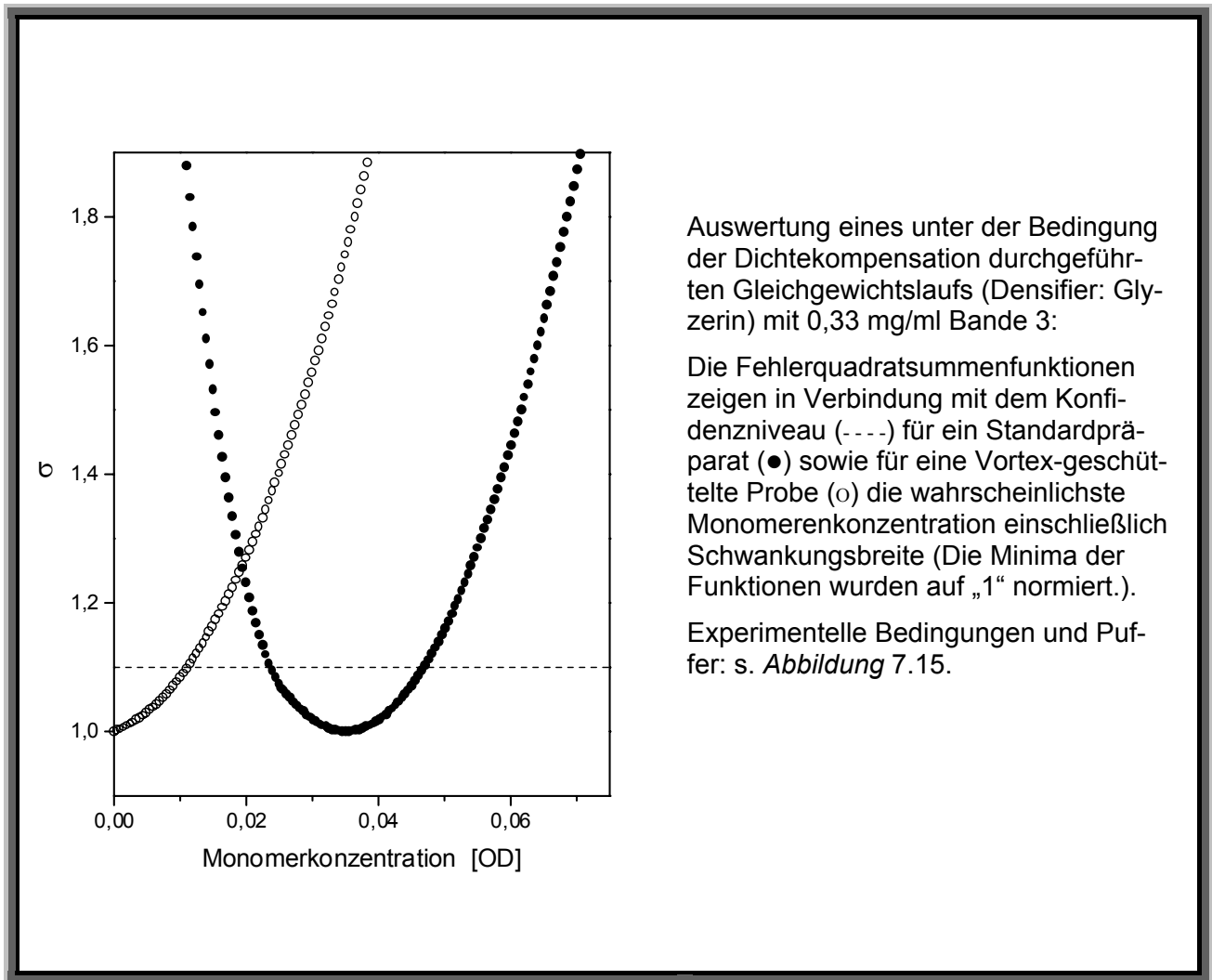


Abbildung 7.17

Präparat 4/4:

Das Präparat wurde in sechs Teile geteilt, womit fünf s-Läufe zu verschiedenen Zeiten und ein Gleichgewichtslauf zwischen dem vorletzten und dem letzten s-Lauf durchgeführt wurden. Bis zur Untersuchung wurden die Proben bei 4°C unter Stickstoff gelagert. Die verschiedenen Läufe und die Zeit zwischen Ende der Präparation und jeweiligem Laufbeginn sind in *Tabelle 7-6* aufgeführt.

Tabelle 7-6

Lauf	Zeit nach Ende der Präparation
s-Lauf I	2 h
s-Lauf II	21 h
s-Lauf III	44 h
s-Lauf IV	87 h
Gleichgewichtslauf	92 h
s-Lauf V	236 h

Die Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente wurden bei einer Rotordrehzahl von 40 000 Upm und einer Rotortemperatur von 4°C durchgeführt. Die Probenkammern waren mit jeweils 200-220 µl Bande 3-Lösung gefüllt. Der Sedimentationsverlauf wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm beobachtet. Aufgrund der von Glycerin verursachten hohen Viskosität sedimentierte und diffundierte das Protein vergleichsweise langsam, so daß die A(r)-Daten mit 5 „averages“ aufgenommen werden konnten. Dadurch wurden die statistischen Schwankungen der Daten im Vergleich zu den Experimenten ohne Dichtekompensation bzw. mit D₂O als Densifier entsprechend verringert. Dementsprechend wurde, im Gegensatz zum s-Lauf in Gegenwart von D₂O, das Konfidenzniveau auf 0,95 gesetzt.

Der Auswertung der A(r)-Daten lagen folgende Parameterwerte zugrunde: Partialspezifisches Volumen des Protein-Detergens-Komplexes: $\bar{v} = 0,82$ ml/g. Pufferdichte: $\rho = 1,033$ g/ml. Viskosität des Puffers: $\eta = 2,29$ cPoise. Relativer Reibungskoeffizient: $f/f_0 = 1,7$.

Die aus der Analyse der fünf s-Läufe resultierenden c(s)-Verteilungen sind in *Abbildung 7.18* gezeigt, ebenso die Residuen der Anpassungen (Bitmapdarstellung). Die Abbildung offenbart ein komplexes Verhalten der Bande 3: Man findet einerseits im c(s)-Plot von s-Lauf I alle vier bisher charakterisierten Peaks (in *Abbildung 7.18* numeriert): einen Peak zwischen $s_{20,W} = 2$ S und $s_{20,W} = 3$ S („1“), den Hauptpeak im Bereich von 7 S („2“), einen in den Hauptpeak übergehenden Peak um 9 S („3“) und einen Peak jenseits von 12 S („4“; wertet man letzteren analog zum obigen 13,9 S-Peak aus, so folgt für tetramere Bande 3 mit $s_{20,W} = 12,5$ S: $f/f_0 = 1,58$ bzw. Prolat-Achsenverhältnis = 12:1). Andererseits hat der Zustand aus s-Lauf I nicht bestand: Peak 4 ist bereits ab s-Lauf II nicht mehr vorhanden, Peak 1, in s-Lauf II deutlich verkleinert, fehlt ab s-Lauf III; Peak 3 scheint sukzessive in den Hauptpeak überzugehen, während dieser zunächst zu kleineren, später zu größeren s-Werten driftet (die Änderung des Präparats wird begleitet von mit der Zeit abnehmender Systematik in den Residuen). In

Tabelle 7-7 sind die $s_{20,w}$ -Werte der (lokalen) Maxima zu den verschiedenen Läufen zusammengestellt.

Für jeden Lauf wurde die entsprechende Probe auf zwei Probenkammern verteilt. Die Auswertung der jeweils zweiten Kammer zeigte die Signifikanz der den $c(s)$ -Verteilungen entnommenen Informationen: Die Verteilungen aus *Abbildung 7.18* bzw. die s -Werte aus *Tabelle 7-7* wurden exzellent reproduziert, offenbar dank des geringen Rauschens der Rohdaten.

Die in *Abbildung 7.18* und *Tabelle 7-7* dokumentierte komplizierte Verhaltensweise der Bande 3 ist mit herkömmlichen Mitteln der s -Wert-Analyse nicht erkennbar: Eine Auswertung der fünf Läufe mit der „Methode der zweiten Momente“ oder der „Transportmethode“ liefert in allen Fällen nahezu den selben s -Wert; auch die $g(s)$ -Analyse nivelliert tendenziell die Unterschiede. Selbst die van Holde-Weischet-Methode, die bis zur Entwicklung der $c(s)$ -Analyse im Ruf stand, das geeignetste Verfahren zum Aufspüren von Inhomogenitäten zu sein, liefert kaum Hinweise darauf, daß neben der Hauptkomponente noch weitere Bestandteile existieren. Dies ist in *Abbildung 7.19* zu sehen, welche die van Holde-Weischet-Analyse der drei letzten s -Läufe zeigt: Im Falle von s -Lauf III und s -Lauf IV ist eine Inhomogenität angedeutet, in s -Lauf V scheint das Präparat homogen. Die beiden ersten Läufe, in denen das Präparat gemäß $c(s)$ -Analyse die offensichtlichsten Inhomogenitäten aufwies, konnten nicht sinnvoll ausgewertet werden, da wegen breit ausschmierender Sedimentationsbanden – ein Zeichen von Inhomogenität! – zu wenig Scans sowohl eine depletierte Zone in Meniskusnähe als auch ein eindeutiges Plateau zeigten (und damit die Voraussetzung dafür erfüllten, in die van Holde-Weischet-Analyse miteinbezogen zu werden).

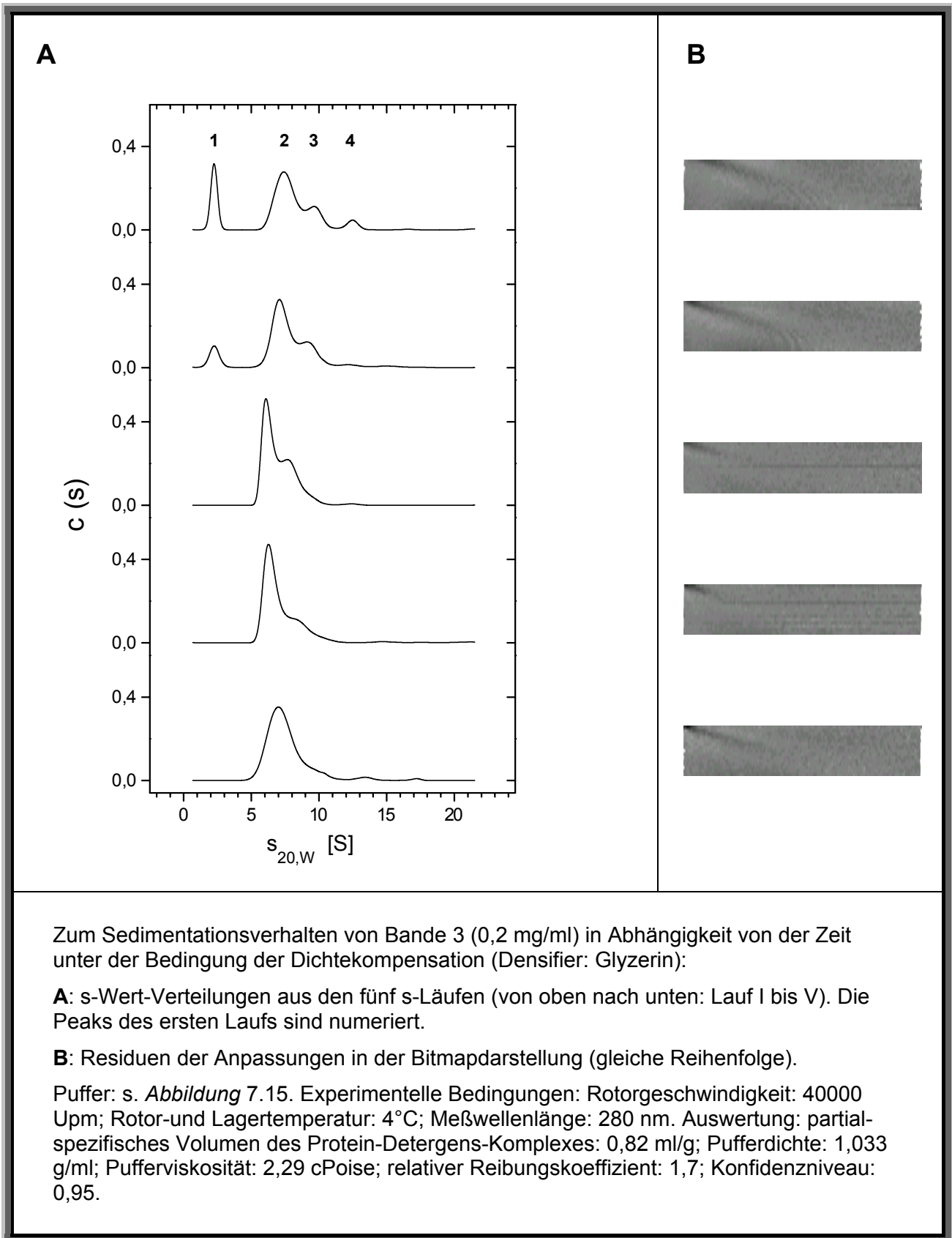
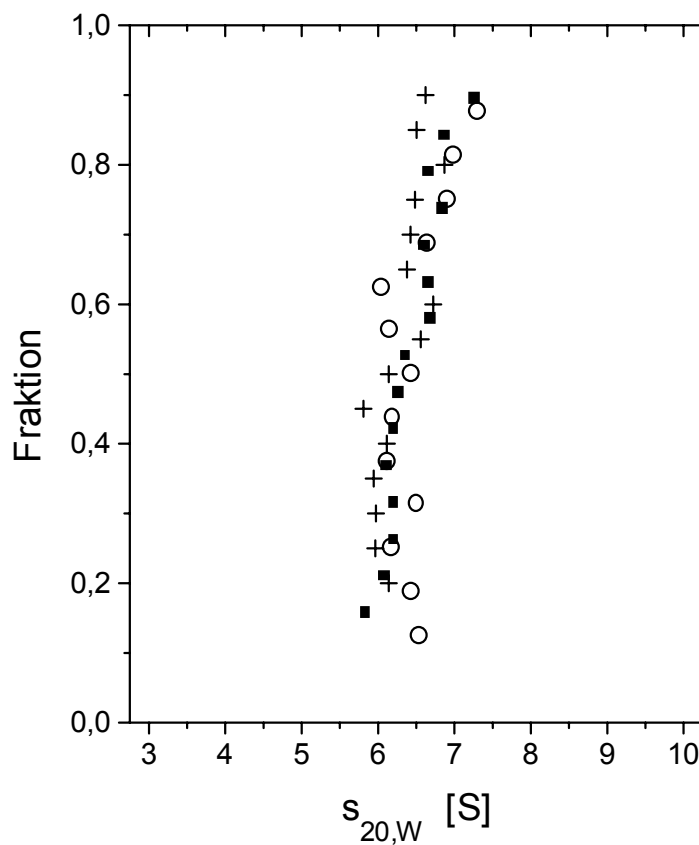


Abbildung 7.18

Tabelle 7-7

	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4
s-Lauf I	2,3 S	7,3 S	9,7 S	12,5 S
s-Lauf II	2,3 S	7,1 S	9,2 S	—
s-Lauf III	—	6,1 S	7,8 S	—
s-Lauf IV	—	6,3 S	—	—
s-Lauf V	—	7,0 S	—	—



van Holde-Weischet-Analyse
der s-Läufe III (■), IV (○) und V
(+). Die Läufe I und II waren
nicht auswertbar.

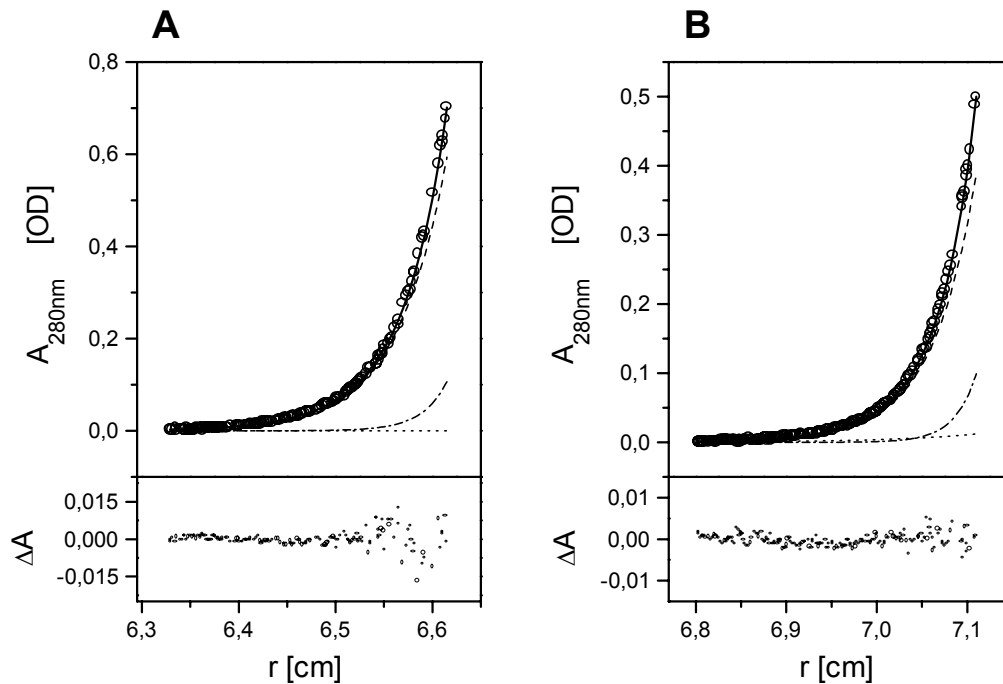
Abbildung 7.19

Um die Resultate der s-Läufe besser einordnen zu können, wird das zwischen s-Lauf IV und s-Lauf V eingefügte Gleichgewichtsexperiment herangezogen. Dieses wurde in einer Kammer mit der entsprechenden Probe (0,2 mg/ml Bande 3) sowie in einer weiteren Kammer mit auf 0,1 mg/ml Bande 3 verdünntem *Präparat 4/4* durchgeführt (Füllvolumen: ca. 135 µl). Die Rotorgeschwindigkeit betrug 11 000 Upm, die Rotortemperatur 4°C. Die beiden Gleichgewichtsprofile (Gleichgewicht ca. 60 h nach Laufbeginn), zu sehen in *Abbildung 7.20*, wurden bei 280 nm aufgenommen (90 „averages“) und mit freier Basis sowie den Molmassen für Bande 3-Monomer, -Dimer und -Tetramer angepaßt ($\bar{v} \rho = 0,764$). Die aus den optimalen Anpassungen (s. *Abbildung 7.20*) hervorgehenden Anteile der Bande 3-Oligomere an der Gesamtabsorption des Proteins sind in *Tabelle 7-8* aufgeführt, ebenso die (unsymmetrischen) Fehlerbereiche.

Der Tabelle ist zu entnehmen, daß sowohl das unveränderte als auch das verdünnte *Präparat 4/4* zwischen den beiden letzten s-Läufen im Wesentlichen dimere Bande 3 enthielten, darüberhinaus signifikant Tetramer, dagegen kein oder wenig Monomer. Dies korreliert mit den c(s)-Verteilungen aus den beiden letzten s-Läufen.

Tabelle 7-8

	Monomeranteil			Dimeranteil			Tetrameranteil		
	Minimum	Optimum	Maximum	Minimum	Optimum	Maximum	Minimum	Optimum	Maximum
unverdünnt	0%	0%	6%	78%	88%	92%	8%	12%	16%
verdünnt	0%	4%	8%	73%	80%	85%	12%	16%	19%



Gleichgewichtsanalyse mit mehrere Tage alter Bande 3 unter Verwendung von Glycerin als Densifier:

Oben: Gleichgewichts- $A(r)$ -Daten (O) von 0,2 mg/ml Bande 3 (A) und 0,1 mg/ml Bande 3 (B), jeweils mit optimaler Anpassung (—), gebildet aus Basislinie, Monomer (.....), Dimer (----) und Tetramer (-----). Unten: Residuen der jeweiligen Anpassung.

Experimentelle Bedingungen: Rotorgeschwindigkeit: 11000 Upm; Rotortemperatur: 4°C; Meßwellenlänge: 280 nm. Puffer: s. *Abbildung 7.15*.

Abbildung 7.20

Das in *Abbildung 7.18* dokumentierte Verhalten der Bande 3 läßt einen weiten Interpretationsspielraum zu. In Verbindung mit dem Resultat des zugehörigen Gleichgewichtslaufs scheint die naheliegendste – wenn auch spekulative! – Erklärung zu sein, daß sich ein Monomer-Dimer-Tetramer-Assoziationsgleichgewicht mit langer Gleichgewichtseinstellungsdauer innerhalb von Tagen zu einem schnellen Gleichgewicht wandelt, begleitet von einem kontinuierlichen Verlust an monomerem Protein.

Die am Ende von Kap. 7.4.1 gestellten Fragen, aus denen sich die Motivation für Untersuchungen unter der Bedingung der Dichtekompensation speiste, können nach Abschluß der Bande 3- C_{12}E_9 -Experimente wie folgt beantwortet werden:

Die Peaks, die in den ohne Dichtekompensation zustande gekommenen $c(s)$ -Verteilungen zu sehen waren, ließen sich im Prinzip unter Kompensationsbedingungen reproduzieren. Mit Blick auf die langsame Komponente bedeutet dies, daß jeder dieser Peaks Proteinkomponenten abbildet. Somit handelt es sich angesichts der gezeigten Gleichgewichtsexperimente bei der langsamen Komponente höchstwahrscheinlich um monomere Bande 3, zumal der benachbarte Peak, der Hauptpeak, eindeutig dem Dimer zugeordnet werden konnte. Darüber hinaus wurde in den Gleichgewichtsläufen das Tetramer gefunden, ein höheres Oligomer – unter schonenden Bedingungen – dagegen nicht. Trimere Bande 3 konnte nicht ausgeschlossen, aber auch nicht nachgewiesen werden. Somit spricht die Beobachtung von zwei signifikanten Komponenten, die schneller als die Hauptkomponente sedimentieren, für verschiedene tetramere Zustände.

7.5 Die Untersuchung des Bande 3-Proteins in rTX-100-Lösungen

Wie $C_{12}E_9$ gilt rTX-100 als Detergens, welches den nativen Zustand der Bande 3 während und nach deren Solubilisierung konserviert [106] [109]. Da die Dichte von rTX-100 zudem – wie diejenige von $C_{12}E_9$ – ohne nennenswerte Beeinflussung des Protein- \bar{v} zu kompensieren ist, kann rTX-100 zur Überprüfung und Ergänzung des bisher Gesagten eingesetzt werden.

Die Präparation der Bande 3 erfolgte ab Beginn der Hauptextraktion in Gegenwart von rTX-100 und 9,7% (w/v) Saccharose. Nach dem Ionenaustauscherschritt wurde das Präparat geteilt. Die beiden Teile wurden während der Gelfiltrationschromatographie auf verschiedene pH-Werte eingestellt, alle übrigen Bedingungen blieben identisch. Die beiden endgültigen Präparate enthielten ca. 0,2 mg/ml Bande 3, das Protein lag dabei in folgendem Puffer vor:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0 bzw. pH 9,0)

50 mM NaCl

0,5 mM EDTA

0,2 mM DTT

0,3% (w/v) rTX-100

9,7% (w/v) Saccharose

Die beiden Proben wurden in jeweils drei Probenkammern (Füllvolumen: 130-140 μ l) im Sedimentationsgleichgewicht untersucht (Rotordrehzahl: 12 000 Upm; Rotortemperatur: 4°C).⁷¹

⁷¹ Der jeweilige Anteil der beiden Proben, der nicht für die Zentrifugalanalyse benötigt wurde, wurde bei 4°C aufbewahrt, bis er gegen Ende des Gleichgewichtslaufs, etwa zu der Zeit, in der die Gleichgewichtsprofile

Das Gleichgewicht war ca. 50-60 h nach Beginn der Zentrifugation eingestellt (unter Zuhilfenahme der Overspeed-Technik). Die Gleichgewichtsprofile wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen, außerdem bei 250 nm, einem Absorptionsminimum von Triton (damit wird Triton als Filter gegen Streustrahlung genutzt, wodurch sich die Meßgenauigkeit erhöht [114]). Bei beiden Wellenlängen wurden die Messungen mit 70 „averages“ durchgeführt. Die Profile (pro Probe sechs Datensätze) wurden mit freier Basislinie und mit den Molmassen des monomeren, dimeren, und tetrameren Proteins angepaßt (mit $\rho = 1,043 \text{ g/ml}$: $\bar{v}\rho = 0,772$). Die optimalen Anpassungen waren von hoher Qualität (die Residuen waren statistisch um „0“ verteilt); die aus ihnen folgenden Anteile der einzelnen Oligomere an der Gesamtabsorption der Bande 3 wurden für ein Oligomer aus einer Probe gemittelt. Die Mittelwerte einschließlich Fehler sind in *Tabelle 7-9* zusammengestellt.

Tabelle 7-9

	Monomer (Anteil in %)	Dimer (Anteil in %)	Tetramer (Anteil in %)
pH: 8,0	11 ± 3	57 ± 7	32 ± 6
pH: 9,0	18 ± 4	63 ± 7	19 ± 4

Das Ergebnis erinnert an das Verhalten der Bande 3 in $C_{12}E_9$ -Lösungen: Die Hauptkomponente besteht aus dimerem Protein, daneben liegen signifikante Anteile Monomer und Tetramer vor. Allerdings ist bei pH 8, dem pH-Wert, bei dem die Bande 3- $C_{12}E_9$ -Untersuchungen durchgeführt wurden, in Gegenwart von rTX-100 ein erhöhter Tetrameranteil zu beobachten. Dieser wird bei pH 9 deutlich reduziert (während monomere Bande 3 vom höheren pH-Wert begünstigt scheint). Das Schwinden der tetrameren Form mit zunehmendem pH-Wert – und damit ihre Beteiligung an einem Assoziationsgleichgewicht – wurde bereits in [82] gezeigt, wo dieser Effekt mit dem Verhalten der Bande 3-Ankyrin-Bindung korreliert wurde. Die pH-Abhängigkeit dieser Bindung wurde zuvor von Thevenin und Low nachgewiesen [143] und

aufgenommen wurden, der Rekonstitutionsprozedur unterworfen wurde (ab Beginn der Rekonstitution wurden beide Proben identisch behandelt). Die anschließenden Flux-Messungen zeigten in beiden Fällen hemmbaren Anionentransport, wobei derjenige des bei pH 8 gelagerten Proteins deutlicher zu erkennen war. Beide Flüsse waren allerdings von geringer Qualität verglichen mit dem in *Abbildung 7.6* dargestellten, der von einem frischen Bande 3-Präparat stammt.

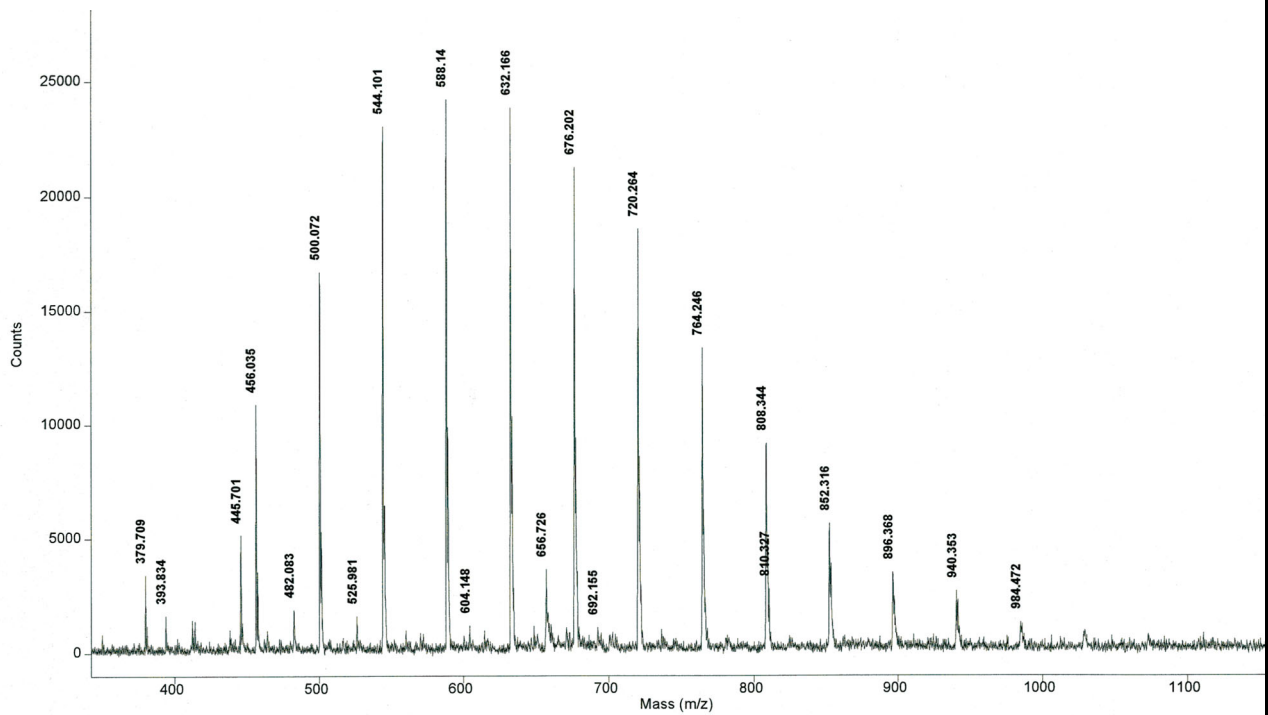
auf die Existenz von drei pH-abhängigen Konformationen der zytoplasmatischen Domäne der Bande 3 zurückgeführt [74].

Abschließend sei ein „erfolgloses“, dennoch bemerkenswertes Experiment dokumentiert.

Die Solubilisierung und Aufreinigung der Bande 3 wurde im Unterschied zu obiger Präparation in Gegenwart von ausdrücklich **peroxyd- und carbonylfreiem** reduzierten Triton X-100 („rTX-100/pc“) durchgeführt. Dieses Detergens wurde vom kommerziellen Hersteller einem offenbar kostenaufwendigen zusätzlichen Reinigungsschritt unterzogen und unter Sauerstoffausschluß in Ampullen geliefert.

Die Präparation erfolgte wie oben ab einschließlich Hauptextraktion in Gegenwart von 9,7% (w/v) Saccharose. Nach dem Ionenaustauscherschritt mußte das Experiment allerdings abgebrochen werden, da die Hauptelution kein Maximum wie in *Abbildung 7.3* dargestellt lieferte. Stattdessen stieg mit zunehmender NaCl-Konzentration die Proteinkonzentration kontinuierlich. Die Fraktionen der Hauptelution ab etwa 200 mM NaCl zeigten zudem Absorptionsspektren, die den Schluß auf in erheblichem Maße aggregiertes Protein nahelegten (s. *Abbildung 7.4*, gestrichelte Linie). Da der Grund für diese deutliche Abweichung vom üblichen Verlauf einer Bande 3-Präparation in der Variation des Detergens` zu vermuten ist, wurden rTX-100 und rTX-100/pc MALDI-massenspektrometrisch untersucht und verglichen (MALDI: „matrix-assisted laser desorption ionisation“). Das Ergebnis ist in *Abbildung 7.21* zu sehen: Die beiden Detergenzien lieferten Massenspektren, die sich kaum unterscheiden.

Angeichts des Umstandes, daß beide in diesem Kapitel angeführten Präparationen bis zur Hauptelution der Ionenaustauscherchromatographie – abgesehen vom verwendeten Detergens – identisch durchgeführt wurden, zeigt die Differenz in den Resultaten, wie entscheidend die Wahl des Detergens` bei der Analyse eines empfindlichen Proteins ist. Erstaunlicherweise scheint aber ausgerechnet dasjenige Detergens dem Protein zu schaden (bzw. es nicht ausreichend zu schützen), welches von proteinschädigenden Substanzen befreit wurde. Da nun im Molmassenbereich der Detergenskomponenten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Detergenspräparaten zu erkennen waren, ergibt sich der Verdacht, daß zusätzliche Reinigungsschritte folgenschwere Verunreinigungen an anderer Stelle, z.B. im niedermolekularen Bereich, verursachen. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits früher für das großtechnisch hergestellte, billige Detergens Ammonyx-LO und seine teure „Reinform“ LDAO beobachtet (D. Schubert, persönliche Mitteilung).



MALDI-Massenspektrometrie von rTX-100 (oben) und rTX-100/pc (unten).⁷² Die signifikanten Signale sind mit den zugehörigen Molmassen beschriftet (Einheit: Da).

Abbildung 7.21

⁷² Durchgeführt von Thomas Russ, Institut für Instrumentelle Analytische Chemie, JWG-Universität Frankfurt am Main; Meßgerät: Voyager RP-DE.

7.6 Diskussion

Wie oben dargelegt, bildet das Bande 3-Protein der menschlichen Erythrozytenmembran gemäß vorherrschender Meinung stabile Dimere (sowohl in der Membran als auch in Detergenzlösung), obgleich es zahlreiche Untersuchungen gibt, in denen nicht-dimere Bande 3-Formen gefunden wurden. Dieser Widerspruch ist bis heute nicht aufgelöst, auch wenn es Versuche gibt, nicht-dimere Bande 3 als Präparationsartefakt einzuordnen [93] oder tetrameres Protein als durch Bande 3-Bindungspartner zusammengeführtes Dimer-Paar zu identifizieren [84].

In der vorliegenden Arbeit spiegelt sich die Vielfalt der Ansichten zum Assoziationsverhalten der Bande 3 wider: In manchen s-Läufen zeigte sich das Protein als kompliziertes System, in manchen als einfaches. Der Anteil von Oligomeren mit mehr als zwei Protomeren schwankte zwischen 0% und über 30%; auch der Anteil einer kleinen Komponente streute, wenn auch nicht so deutlich. Manche Präparate zeigten das Vorliegen eines Assoziationsgleichgewichts, gleichzeitig schienen die Verhältnisse von stabilen Zuständen dominiert (die auch von sehr langsamen Assoziationsgleichgewichten vorgetäuscht werden könnten).

Allerdings erlauben obige Resultate eine gewisse Systematisierung und damit eine Interpretation dieser Vielfalt:

Monomer:

Die langsamste in s-Läufen gefundene Komponente ist eine Proteinkomponente, was daraus hervorgeht, daß sie (auch) unter Kompensationsbedingungen gefunden wurde. Ihr Anteil am gesamten Protein ist konzentrationsabhängig, was jedoch nur bei großen Konzentrationsunterschieden in Erscheinung trat. In Gleichgewichtsprofilen zeigte sie sich dadurch, daß deren Anpassung eine Komponente benötigte, die kleiner als das Dimer ist. Da es keinen Hinweis auf das Vorliegen eines – wohldefinierten! – Proteinfragments gibt, muß die langsame/ kleine Komponente mit dem Monomer identifiziert werden.

Der s-Wert des Monomers beträgt $s_{20,w} = (2,3 \pm 0,2)$ S, er liegt damit signifikant niedriger als der in der Literatur angegebene [90], welcher allerdings auf keiner direkten Messung beruht, sondern auf einer Extrapolation. Der aus der vorliegenden Arbeit stammende s-Wert für das Bande 3-Monomer verweist auf ein langgestrecktes flexibles Molekül.

Hohe Verformbarkeit könnte ein Grund sein für die Labilität des monomeren Proteins. Diese zeigte sich mehrfach: Durch Lagerung, Erwärmung oder Schütteln eines Präparats konnte der Monomergehalt verringert werden; selbst Verdünnen scheint Monomer zu

zerstören (hierbei spielen möglicherweise Wandeffekte eine Rolle; vgl auch [111]). Andererseits schien der Einfluß von quervernetzenden Verunreinigungen, z.B. Peroxiden, nicht entscheidend zu sein.

Dimer:

Die dominierende Komponente stellt mit Sicherheit dimere Bande 3 dar. Ihr s-Wert ($s_{20,W} \approx 7$ S) entspricht dem Literaturwert [90].

Tetramer:

Alle relativ zur Hauptkomponente schneller sedimentierenden Bestandteile, im Wesentlichen eine 9 S- und eine 13 S-Komponente, dürften tetramerer Bande 3 zuzuordnen sein: Alle Bande 3-Gleichgewichtsprofile konnten mit dem Modell „Monomer-Dimer-Tetramer“ optimal angepaßt werden, mit anderen Worten, es waren nur die genannten Oligomere signifikant. Damit scheint das Protein sehr unterschiedliche Tetramer-Arten bilden zu können.

Folgende Vorstellung vom Zustandekommen verschiedener tetramerer Zustände ist mit den vorliegenden Resultaten verträglich: In der Membran bestehe ein Tetramer aus parallel assoziierten Dimeren, wobei sich die Bereiche eines Dimers, die am anderen Dimer binden, über seine gesamte Länge verteilen sollen. Aufgrund der Geometrie des Bilayers sei dies der bevorzugte tetramere Zustand. Mit der Solubilisation, d.h. mit veränderter Geometrie der Proteinumgebung, seien tetramere Zustände mit verringerter Dimer-Dimer-Kontaktfläche wahrscheinlicher. Damit verschwände sukzessive die ursprüngliche Form zugunsten von Gebilden mit höherem Reibungskoeffizienten und mit der Tendenz zum Zerfall in Dimere bzw. zum Übergang zu noch instabileren Tetrameren.

Assoziationsgleichgewicht:

Wenn die eben ausgeführte Vorstellung von der Natur des solubilisierten Tetrameren korrekt ist, folgt daraus unmittelbar ein – mit der Zeit zunächst zunehmend schnelles – Assoziationsgleichgewicht zwischen Dimer und Tetramer. Dies paßt zu den $c(s)$ -Verteilungen der s-Lauf-Serie (s. *Abbildung 7.18*), die zeigen, daß die rechten Peaks im Laufe der Zeit mit dem Hauptpeak verschmelzen (Ein weiterer Beleg für eine Beteiligung tetramerer Bande 3 an einem Assoziationsgleichgewicht ist die Abhängigkeit des Tetramerenanteils vom pH-Wert).

Ebenfalls an einem Assoziationsgleichgewicht beteiligt ist das Bande 3-Monomer, wie die Abhängigkeit des Monomeranteils von der Proteinkonzentration andeutet.

Bei allen Hinweisen auf ein Assoziationsgleichgewicht: Die Dominanz der Dimer-Fraktion, die mit der Alterung bzw. nach (vorsichtiger) Fehlbehandlung der Bande 3 tendenziell zunimmt, legt den Schluß nahe, daß die reversiblen Bande 3-Zustände von einem stabilen (Dimer-) Zustand überlagert sind und in ihn sukzessive aufgehen.

Zusammengefaßt deuten die Ergebnisse darauf hin, daß mild solubilisiertes und aufgereinigtes Bande 3-Protein im Prinzip im Selbstassoziationsgleichgewicht, an welchem sich Monomer, Dimer und verschiedene Tetramierzustände beteiligen, vorliegt, jedoch kontinuierlich oder schrittweise über ein schnelles Dimer-Tetramer-Gleichgewicht einem stabilen (dimeren) Zustand zustrebt.

Trifft diese Zusammenfassung zu, so erklärt sich unmittelbar die Meinungsvielfalt in der einschlägigen Literatur: Von Präparationsvorschrift zu Präparationsvorschrift, sogar von Präparat zu Präparat können unterschiedliche Stadien der Entwicklung solubilisierter Bande 3 getroffen und festgehalten werden – vom Assoziationsgleichgewicht bis zum irreversiblen Zustand. Unterschiede in den Ergebnissen sind insbesondere darüber vorgezeichnet, daß die einzelnen Experimentatoren, selbst innerhalb einer Arbeitsgruppe, verschiedene Detergenzien verwenden – mitunter ohne es zu wissen: Verfahrensänderungen bei der Herstellung und Reinigung eines Detergens, die dieses – wie gesehen – im speziellen Fall unbrauchbar machen können, werden vom kommerziellen Hersteller üblicherweise nicht mitgeteilt! Noch weniger sind kommerzielle Hersteller bereit, Einblick in die Herstellungsverfahren selbst zu gewähren. Somit ist die Membranproteinforschung mit einer aus wettbewerbsrechtlichen Gründen notorisch unbekannten Größe konfrontiert.

Zu den präparativ bedingten Schwierigkeiten, einheitliche Ergebnisse zur Bande 3-Quartärstruktur zu produzieren, gesellten sich im Falle von Ultrazentrifugenuntersuchungen in der Vergangenheit methodische Einschränkungen: Zum einen gilt es festzuhalten, daß die Bande 3 üblicherweise nicht unter Kompensationsbedingungen untersucht wurde – mit entsprechender Wirkung auf die Meßgenauigkeit. Zum anderen waren die Methoden zur Auswertung von s-Läufen der modernen c(s)-Analyse weit unterlegen. Die vorliegende Arbeit dagegen konnte neben neuen Dichtekompensationsverfahren insbesondere die Vorzüge der neuen s-Wert-Analyse nutzen:

Dichtekompensation:

Die Detergensdichten waren in allen Gleichgewichtsläufen und in den meisten s-Läufen kompensiert. Eingesetzt wurden die Detergenzien C₁₂E₉ und rTX-100, die nicht nur mild, sondern auch von niedriger Dichte sind, so daß sie kompensiert werden konnten, ohne das

partialspezifische Volumen der Bande 3 korrigieren zu müssen. Zur Dichtesteigerung wurden mit einer Ausnahme (D_2O zur Kompensation von $C_{12}E_9$) Saccharose und Glycerin verwendet, in erster Linie, um ihre proteinstabilisierende Wirkung zu nutzen, weiterhin aus Kostengründen sowie wegen ihrer bequemen Handhabung – nicht zuletzt im Falle der Kompensation der rTX-100-Dichte, die mit D_2O nur schwer durchführbar ist.

c(s)-Analyse:

Wie im Vergleich zur durchaus fortschrittlichen van Holde-Weischet-Methode gezeigt werden konnte, wären die hier dargestellten Details der Bande 3-Selbstassoziation ohne *c(s)*-Analyse zu einem Großteil verlorengegangen. So hätte z.B. die in *Abbildung 7.18* dargestellte s-Lauf-Serie mit herkömmlicher Auswertung eine Serie praktisch identischer (mittlerer) s-Werte geliefert! Man sieht: Auch ohne entsprechende präparative Leistung kann sich stabiles Dimer bilden...

Ausblick:

Zum besseren Verständnis der Bande 3-Selbstassoziation ist es notwendig, Bedingungen zu finden, unter denen reversible Zustände in Reinform vorliegen, also ohne Überlagerung mit stabilen Zuständen. Die Schlüsselrolle in dieser Frage scheint das Detergens zu spielen. Damit steht eine Anwendung verschiedener milder Detergenzien auf das Bande 3-Protein auf dem Programm, unter Kompensationsbedingungen und unter Ausschöpfung der Potenzen der *c(s)*-Analyse (die leider erst nach Abschluß der Experimentierphase dieser Arbeit zur Verfügung stand): So sind die Untersuchungen mit Triton fortzuführen, ist die Anwendung DDM- oder Lipid-haltiger Mischmizellen ins Auge zu fassen oder sind neuere Detergenzien wie das kurzkettige Phospholipid „Diheptanoyl-Phosphatidylcholin“ [65] zu testen.

Da eine Vielzahl verschiedener Präparationsbedingungen zahlreiche Bande 3-Präparationen erfordert, ist es wünschenswert, einen „Schnelltest“ zu erarbeiten, der eine erste Selektion von Bedingungen ermöglicht. Vorstellbar ist z.B. eine Bande 3-Präparation, die lediglich Vorextraktion und Hauptextraktion umfaßt (gegebenenfalls mit in der Membran farbstoffmarkierter Bande 3; vgl. [83]), mit dichtekompensiertem Detergens im Hauptextrakt, der unmittelbar einem s-Lauf unterzogen werden kann.

8 Zusammenfassung

Die analytische Ultrazentrifuge ist ein unverzichtbares Instrument zur Charakterisierung von schwachen Protein-Protein-Wechselwirkungen und deren funktioneller oder regulatorischer Bedeutung. Eine besondere Gruppe von Untersuchungsobjekten bilden die integralen Membranproteine, die für eine Ultrazentrifugenanalyse solubilisiert, d.h. aus ihrer natürlichen, hydrophoben Umgebung in wäßriges Milieu überführt werden müssen. Diese Aufgabe wird vom Standpunkt der Erhaltung des natürlichen Proteinzustands am besten von nichtionischen Detergenzien erfüllt, wobei das biochemisch optimale Detergens von Protein zu Protein i.A. verschieden ist. Die notwendige Anwesenheit von Detergens während der Zentrifugenanalyse belastet diese andererseits, da freies wie proteingebundenes Detergens zusätzliche unbekannte Größen darstellen. Diese Unbekannten können durch experimentelle Gleichsetzung von Detergensdichte und Lösungsdichte eliminiert werden (Dichtekompensation). Die Möglichkeiten der etablierten Dichtekompensationsverfahren sind allerdings beschränkt, insbesondere Detergenzien mit hoher Dichte sind damit nicht erfaßbar – ein Mangel, der manche Untersuchung be- oder verhindert.

Aus diesem Grund wurden neue Dichtekompensationsverfahren entwickelt und bestehende verbessert bzw. erweitert: zum einen die Erhöhung der Lösungsdichte durch Zusatz von Saccharose, Glycerin oder einer Saccharose-D₂O-Kombination, zum anderen die Anpassung der Detergensdichte durch Mischen von Detergenzien mit niedriger und mit hoher Dichte. Die neuen Verfahren wurden überprüft, indem ein integrales Membranprotein mit bekannten Eigenschaften, Cytochrom *c*-Oxidase von *Paracoccus denitrificans*, unter Anwendung sowohl der neuen Verfahren als auch der etablierten D₂O-Methode im Sedimentationsgleichgewicht analysiert wurde. Der Vergleich der Ergebnisse zeigte zum einen die Äquivalenz der verschiedenen Methoden im Falle der Kompensation von Detergensdichten, die auf herkömmliche Weise kompensierbar sind, zum andern, daß nach Kompensation deutlich höherer Dichten das partialspezifische Volumen des Proteins zu korrigieren ist.

Eine derartige Korrektur wurde nötig beim Vorhaben, den oligomeren Zustand des Cytochrom bc_1 -Komplexes von *Paracoccus denitrificans* zu bestimmen, da dieses Atmungskettenenzym nur in Gegenwart von DDM, einem Detergens mit hoher Dichte, stabil war. Die Unsicherheit, die sich aus der via Vergleich mit Cytochrom c -Oxidase durchgeführten Korrektur ergab, war nicht relevant, da sich der intakte bc_1 -Komplex in DDM-Lösung als einheitliche Substanz erwies und er damit ein „einfaches“ Problem darstellte.

Die Sedimentationsgleichgewichtsuntersuchung des Proteins unter der Bedingung der Dichtekompensation ergab nach Berücksichtigung des Korrekturterms, daß der solubilisierter, enzymatisch aktive bc_1 -Komplex als Dimer vorliegt. Dieses Ergebnis korreliert mit der aktuellen Vorstellung von der Funktionsweise des Enzyms, derzufolge die dimere Form für den Elektronentransfer notwendig ist.

Komplizierter als der oligomere Zustand des bc_1 -Komplexes ist offenbar das Selbstassoziationsverhalten des Bande 3-Proteins, des Anionenaustauschers aus der menschlichen Erythrozytenmembran: Entgegen der vorherrschenden Meinung, eine in Detergenslösung vorliegende intakte Bande 3 bilde stabile Dimere, weisen die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, daß das solubilierte Protein aus mehreren Oligomeren besteht. So zeigen die vorhandenen Daten neben dimerer Bande 3 die Existenz von monomerem und tetramerem Protein, letztere Form vermutlich in unterschiedlichen Zuständen, und verweisen auf ein Assoziationsgleichgewicht zwischen den Oligomeren, vermutlich überlagert durch stabiles Dimer. Letzteres erscheint als „Grenzfall“ eines Bande 3-Präparats, der nach langer Lagerung und/ oder nach suboptimaler Behandlung eintritt.

Wegen der Komplexität des Bande 3-Verhaltens konnten die Zentrifugenuntersuchungen nur in Gegenwart von Detergenzien durchgeführt werden, deren Dichte eine Kompensation ohne Korrekturbedarf zuläßt. Darüber hinaus kamen wegen der offensichtlichen Empfindlichkeit der Bande 3 nur sehr milde Detergenzien zum Einsatz: $C_{12}E_9$ und Triton X-100 (reduzierte Form). Aus selbigem Grund wurde die Detergensdichte bevorzugt mit Saccharose oder Glycerin kompensiert, deren proteinstabilisierende Wirkung bekannt ist.

9 Anhang

9.1 Anhang 1: Verzeichnis physikalischer Symbole

Symbol	Bedeutung	Symbol	Bedeutung
A	Absorption	P	Druck
C	Stoffmengenkonzentration	R	Gaskonstante
c	Massenkonzentration	r	Abstand von der Drehachse
D	Diffusionskoeffizient	r_b	Bodenposition
d	Schichtdicke	r_m	Meniskusposition
F	(Zentrifugal-)Kraft	s	Sedimentationskoeffizient
f	Reibungskoeffizient	T	(absolute) Temperatur
f/f_0	relativer Reibungskoeffizient	t	Zeit
G	freie Enthalpie	V	Volumen
I	Lichtintensität	\bar{v}	partialspezifisches Volumen
J_i	(Massen-)Fluß eines in Lsg. befindlichen Stoffes	$\langle v \rangle$	mittlere Geschwindigkeit
k	Boltzmannkonstante	X	generalisierte Kraft
K_A, K_D	Assoziations- bzw. Dissoziationskonstante, auf Stoffmengenkonzentration bezogen	ϵ	Extinktionskoeffizient
k_A, k_D	Assoziations- bzw. Dissoziationskonstante, auf Massenkonzentration bezogen	η	dynamische Viskosität
L_{ij}	Proportionalitätsfaktor	φ	Winkel
M	Molmasse	λ	Wellenlänge
m	Masse (eines Teilchens)	μ	chemisches Potential (auf die Masse bezogen)
M_{eff}	effektive Molmasse	μ^0	μ unter Standardbedingungen
N_A	Avogadrozahl	ρ	Massendichte (einer Lösung)
		σ	Fehlerquadratsumme
		ω	Winkelgeschwindigkeit

9.2 Anhang 2: Zur Dichtekompensation von DDM

9.2.1 Herstellung der Lösungen zur Ermittlung der Kompensationsbedingung

MES-Puffer:

Stammlösungen:

1A:	500 mM MES/NaOH (pH 6) 3 000 mM NaCl in D ₂ O	1B:	500 mM MES/NaOH (pH 6) 3 000 mM NaCl in H ₂ O
2A:	50% (w/v) Saccharose in D ₂ O	2B:	50% (w/v) Saccharose in H ₂ O
3A:	2% (w/v) DDM in D ₂ O + 0,5 mg DPH / g DDM	3B:	2% (w/v) DDM in H ₂ O

außerdem NaOH in D₂O zur Einstellung des pH-Werts in D₂O-haltigen Puffern.

Die Lösungen **1A**, **2A**, und **3A** werden mit **D₂O** zu folgender Zusammensetzung verdünnt:

50 mM MES/NaOH (pH 6)
300 mM NaCl
0,2% (w/v) DDM (DPH-markiert)
X% (w/v) Saccharose ($20 \leq X \leq 30$)
100% D₂O

(Lösung A)

die Lösungen **1B**, **2B**, und **3B** mit **H₂O** zu:

50 mM MES/NaOH (pH 6)
300 mM NaCl
0,2% (w/v) DDM
X% (w/v) Saccharose ($20 \leq X \leq 30$)
0% D₂O

(Lösung B)

Schließlich werden 19 Volumeneinheiten **Lösung A** mit 1 Volumeneinheit **Lösung B** vermischt, so daß man folgende endgültige Zusammensetzung des Puffers erhält:

50 mM MES/NaOH (pH 6)
300 mM NaCl
0,2% (w/v) DDM (DPH-markiert)
X% (w/v) Saccharose ($20 \leq X \leq 30$)
95% D₂O / 5% H₂O

Tris-Puffer:

Analog wurden folgende Lösungen hergestellt (HCl nicht deuteriert):

10 mM Tris/HCl (pH 8)

50 mM NaCl

0,5 mM EDTA

0,2% (w/v) DDM (DPH-markiert)

X% (w/v) Saccharose ($26 \leq \mathbf{X} \leq 30$)

95% D₂O / 5% H₂O

9.2.2 Überführung von Protein in den Kompensationspuffer

MES-Puffer:

Cytochrom *c*-Oxidase bzw. *bc*₁-Komplex, vorliegend in 50 mM MES/NaOH (pH 6); 300 mM NaCl; 0,02% (w/v) DDM („pH 6“), wurde mit 50 mM MES/NaOH (pH 6); 300 mM NaCl; 0,02% (w/v) DDM; 50% (w/v) Saccharose so verdünnt, daß es in

50 mM MES/NaOH (pH 6)
 300 mM NaCl
 0,02% (w/v) DDM
 27,6% (w/v) Saccharose
 Wasseranteil: 100% (v/v) H₂O

vorlag. 0,8 ml dieser Proteinlösung wurde anschließend in 15,2 ml

50 mM MES/NaOH (pH 6)
 300 mM NaCl
 0,02% (w/v) DDM
 27,6% (w/v) Saccharose
 Wasseranteil: 100% (v/v) D₂O

für 6 Stunden unter kräftigem Rühren in einem 25 ml Meßzylinder dialysiert. Damit lag das Protein schließlich in folgendem Kompensationspuffer vor:

50 mM MES/NaOH (pH 6)
 300 mM NaCl
 0,02% (w/v) DDM
 27,6% (w/v) Saccharose
 95% D₂O / 5% H₂O

Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Tris-Puffer:

Analog wurde in 10 mM Tris/HCl (pH 8); 50 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,02% (w/v) DDM („pH 8“) vorliegende Cytochrom *c*-Oxidase in folgenden Kompensationspuffer überführt:

10 mM Tris/HCl (pH 8)
 50 mM NaCl
 0,5 mM EDTA
 0,02% (w/v) DDM
 30,2% (w/v) Saccharose
 95% D₂O / 5% H₂O

9.3 Anhang 3: Materialien und Methoden

9.3.1 Materialverzeichnis

9.3.1.1 Proteine

- Cytochrom *c*-Oxidase von *Paracoccus denitrificans*: Präpariert von Hans-Werner Müller bzw. Oliver Anderka (Institut für Biophysikalische Chemie und Biochemie, Abt. Molekulare Genetik, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main).
- Cytochrom *bc₁*-Komplex von *Paracoccus denitrificans*: Präpariert von Oliver Anderka (Institut für Biophysikalische Chemie und Biochemie, Abt. Molekulare Genetik, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main).
- Bande 3-Protein der menschlichen Erythrozytenmembran.

9.3.1.2 Detergenzien und Lipide

- Brij 58: *Serva*.
- Desoxycholsäure (DOC): *Serva*.
- n-Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM): *Biomol*.
- n-Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM); „Ultrol Grade“: *Calbiochem*.
- Lauryldimethylamin-n-Oxid (LDAO); 98%: *Fluka*.
- Natriumdodecylsulfat (SDS): *Serva*.
- Octylglucosid: *Boehringer Mannheim*.
- Pentadecafluorooctansäure: *Fluorochem Limited*.
- Phosphatidylcholin aus Hühnerei (Ei-PC); 99%: *Lipid Products*.
- Polyoxyethylen 20 Isohexadecylether (C₁₆E₂₀): *Sigma-Aldrich-Fluka*.
- Polyoxyethylen 9 Laurylether (C₁₂E₉, „Thesit“); peroxidfrei: *Boehringer Mannheim*.
- Triton X-100, reduzierte Form (rTX-100): *Sigma-Aldrich*.
- Triton X-100, reduzierte Form (rTX-100/pc); peroxyd- und carbonylfrei: *Sigma-Aldrich*.

9.3.1.3 Weitere Chemikalien

- Acrylamid, Fertiglösungen (Pro PAGE); 6%: *Amresco*.
- 1-Amino-2-hydroxy-naphtalin-4-sulfonsäure; zur Phosphatbestimmung: *Merck*.
- Ammoniak; 33%: *Riedel-de Haën*.
- Ammoniummolybdat; zur Analyse: *Merck*.
- Ammoniumpersulfat; „ACS Grade“: *Amresco*.
- Blue Dextran: *Pharmacia*.
- Bromphenolblau: *Merck*.
- Chloroform; zur Analyse: *Merck*.

- Coomassie Blue G-250: *Serva*.
- Cyclohexanon: *Merck*.
- Deuteriumoxid (D₂O); 99,7%: *Roth*.
- Deuteriumoxid (D₂O); zur Aufreinigung destilliert in der Arbeitsgruppe U. Schubert: *(Kern-) Forschungszentrum Karlsruhe*.
- Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat; zur Analyse: *Merck*.
- 1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien (DPH): *Serva*.
- 1,4-Dithiothreitol (DTT): *Boehringer Mannheim*.
- Essigsäure; zur Analyse: *Roth*.
- Ethanol; 95%: *Apotheke des Universitätsklinikums Frankfurt am Main*.
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, „Titriplex III“); zur Analyse: *Merck*.
- Formaldehyd; 37%: *Roth*.
- Glutardialdehyd; 25%: *Merck*.
- Glycerin; 99,5%: *Roth*.
- H₂DIDS: Synthetisiert in der Arbeitsgruppe H. Fasold.
- Hexan: *Apotheke des Universitätsklinikums Frankfurt am Main*.
- 4-[2-Hydroxyethyl]-1-piperazinethan-sulfonsäure (HEPES); 99%: *Roth*.
- Isopropanol: *Apotheke des Universitätsklinikums Frankfurt am Main*.
- 2-Mercaptoethanol (ME); zur Analyse: *Merck*.
- Methanol; zur Analyse: *Riedel-de Haën*.
- 2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure (MES); 99%: *Roth*.
- Natriumacetat; zur Analyse: *Merck*.
- Natriumchlorid (NaCl); zur Analyse: *Merck*.
- Natriumdisulfit; zur Analyse: *Merck*.
- Natriummetaarsenit; zur Analyse: *Fluka*.
- Natriummetaperiodat; zur Analyse: *Merck*.
- Natriumsulfat; zur Analyse: *Merck*.
- Natriumsulfit, wasserfrei; zur Analyse: *Merck*.
- Natriumtetraborat; zur Analyse: *Serva*.
- Natronlauge (NaOH); zur Analyse: *Roth*.
- Pefabloc SC: *Merck*.
- Phosphorsäure; 85%: *Merck*.
- Radioaktiv markiertes Natriumsulfat (Na₂³⁵SO₄): *Amersham Buchler*.
- Saccharose; reinst: *Merck*.

- Saccharose; reinst: *Roth*.
- Salzsäure (HCl); 32%: *Merck*.
- Schwefelsäure; 97%: *Merck*.
- Silbernitrat; zur Analyse: *Merck*.
- Szintillationsflüssigkeit Quicksafe A: *Zinsser Analytic*.
- N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED): *Serva*.
- 2-Thiobarbitursäure: *Merck*.
- Trinatriumcitrat; 1% in Lösung: *Merck*.
- Tris[Hydroxymethyl]aminomethan (Tris); „Ultrapure“: *United States Biochemical*.
- Wasser (H₂O); Millipore-gefiltert und entgast bzw. abgekocht.

9.3.1.4 Sonstige Materialien

- Chromatographie-Säulen: *Pharmacia*.
- Dialyseschläuche verschiedener Größe: *Roth*.
- Erythrozytenkonzentrat 0Rh⁺; frisch: *Rotes Kreuz, Blutspendedienst*.
- Fertig-Entsalzungssäule Sephadex G-25 PD-10: *Pharmacia*.
- Gel P6-DG: *Bio-Rad*.
- Gel Superose 6 HR 10/30: *Pharmacia*.
- Ionenaustauscher DEAE-Sepharose CL-6B: *Pharmacia*.
- Ionenaustauscher Servacel DEAE 23-SH-Cellulose: *Serva*.
- Leukozytenfilter Sepacell R-200 (II) AS: *Diamed*.
- Minigel-Apparatur: *Biometra*.
- Ultrafiltrationskammer Centriprep, Ausschlußgrenze 50 kDa: *Amicon*.
- Ultrafiltrationskammer Centrisart, Ausschlußgrenze 100 kDa: *Sartorius*.
- Zellulosenitratfilter 15F, Typ 11307: *Sartorius*.

9.3.2 Methodenverzeichnis

- **Analytische Ultrazentrifugation**
Meßgerät: Optima XL-A (*Beckman Instruments*); s. Abschnitt 3.
- **Anionentransportmessungen**
Standardprozedur nach [109] [110], s. auch [36] und Kap. 7.2.6;
Flüssigkeitsszintillationszähler: Tricarb 1600 CA (*Packard*).
- **Dichtemessung**
Meßgerät: Paar DMA 02 Density Meter (*Anton Paar*).
- **Dynamische Lichtstreuung**
S. Kap. 6.1.4.

- **Enzymaktivitätsmessung**
Cytochrom *c*-Oxidase: s. [52];
Cytochrom *bc*₁-Komplex: s. [3] [112].
- **FPLC**
FPLC-Anlage von *Pharmacia LKB*.
- **Massenspektrometrie (MALDI)**
S. Kap. 7.5.
- **Neuraminsäuretest**
Nach [165].
- **Phosphattest**
Nach [6].
- **Photometrie**
Meßgeräte: U-2000 UV-Vis Spektrophotometer (*Hitachi Instruments*);
Durchflußphotometer Optical Unit UV-1 (*Pharmacia*).
- **Präparative Zentrifugation**
S. Kap. 6.1 und Kap. 7.2.
- **Proteinpräparation**
Cytochrom *c*-Oxidase: s. [52] und Kap. 5.3.1.1;
Cytochrom *bc*₁-Komplex: s. [2] [3] [66] [159] und Kap. 6.1;
Bande 3: s. Kap. 7.2.
- **Redox-Spektroskopie**
S. [66].
- **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**
Durchgeführt mit Plattengelen [135] nach [68] [108] oder [38]; Silberfärbung nach [137].
- **Viskosimetrie**
Meßgerät: Ubbelohde Viskosimeter Ref. Nr. 50101 (*Schott*).

10 Literaturverzeichnis

- [1] An XL, Takakuwa Y, Nunomura W, Manno S, Mohandas N. *Modulation of band 3-ankyrin interaction by protein 4.1. Functional implications in regulation of erythrocyte membrane mechanical properties*. J Biol Chem **1996**; 271:33187-33191.
- [2] Anderka O. Diplomarbeit, **1999**. Institut für Biophysikalische Chemie und Biochemie, JWG-Universität Frankfurt am Main.
- [3] Anderka O. Dissertation, in Arbeit. Institut für Biophysikalische Chemie und Biochemie, JWG-Universität Frankfurt am Main.
- [4] Appell KC, Low PS. *Evaluation of structural interdependence of membrane-spanning and cytoplasmic domains of band 3*. Biochemistry **1982**; 21:2151-2157.
- [5] Baldwin RL. *Boundary spreading in sedimentation velocity experiments*. J Phys Chem **1954**; 58:1081-1086.
- [6] Bartlett GR. *Phosphorus assay in column chromatographie*. J Biol Chem **1959**; 234:466-468.
- [7] Beckman. Handbuch zur analytischen Ultrazentrifuge Optima XL-A. Palo Alto: Beckman Instruments, **1995**.
- [8] Berry EA, Guergova-Kuras M, Huang LS, Crofts AR. *Structure and function of cytochrome bc complexes*. Annu Rev Biochem **2000**; 69:1005-1075.
- [9] Blackman SM, Piston DW, Beth AH. *Oligomeric state of human erythrocyte band 3 measured by fluorescence resonance energy homotransfer*. Biophys J **1998**; 75:1117-1130.
- [10] Bleuel M. Diplomarbeit, **1997**. Institut für Biophysik, JWG-Universität Frankfurt am Main.
- [11] Bolli R, Nalecz KA, Azzi A. *The aggregation state of bovine heart cytochrome c oxidase and its kinetics in monomeric and dimeric form*. Arch Biochem Biophys **1985**; 240:102-116.
- [12] Bradbury SL, Jacoby WB. *Glycerol as an enzyme-stabilizing agent: effects on aldehyde dehydrogenase*. Proc Natl Acad Sci USA **1972**; 69:2373-2376.
- [13] Brandt U, Trumpower BL. *The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria*. Crit Rev Biochem Mol Biol **1994**; 29:165-197.
- [14] Brandt U. *The chemistry and mechanics of ubihydroquinone oxidation at center P (Qo) of the cytochrome bc₁ complex*. Biochim Biophys Acta **1998**; 1365:261-268.
- [15] Cantor CR, Schimmel PR. *Biophysical Chemistry*, part II. San Francisco: WH Freeman, **1980**.
- [16] Casey JR, Reithmeier RA. *Analysis of the oligomeric state of Band 3, the anion transport protein of the human erythrocyte membrane, by size exclusion high performance liquid chromatography. Oligomeric stability and origin of heterogeneity*. J Biol Chem **1991**; 266:15726-15737.
- [17] Casey JR, Reithmeier RA. *Anion exchangers in the red cell and beyond*. Biochem Cell Biol **1998**; 76:709-713.

- [18] Casey JR, Reithmeier RA. *Detergent interaction with band 3, a model polytopic membrane protein*. Biochemistry **1993**; 32:1172-1179.
- [19] Chang BS, Beauvais RM, Arakawa T, Narhi LO, Dong A, Aparisio DI, Carpenter JF. *Formation of an active dimer during storage of interleukin-1 receptor antagonist in aqueous solution*. Biophys J **1996**; 71:3399-3406.
- [20] Cohn EJ, Edsall JT. In: *Proteins, Amino Acids and Peptides as Ions and Dipolar Ions* (Hrsg: Cohn EJ, Edsall JT). New York: Hafner Publ Comp, **1943**; 370-381.
- [21] Cölfen H, Boulter JM, Harding SE, Watts A. *Ultracentrifugation studies on the transmembrane domain of the human erythrocyte anion transporter band 3 in the detergent C12E8*. Eur Biophys J **1998**; 27:651-655.
- [22] Cölfen H, Harding SE, Boulter JM, Watts A. *Hydrodynamic examination of the dimeric cytoplasmic domain of the human erythrocyte anion transporter, band 3*. Biophys J **1996**; 71:1611-1615.
- [23] Crofts AR, Barquera B, Gennis RB, Kuras R, Guergova-Kuras M, Berry EA. *The mechanism of ubiquinol oxidation by the bc1 complex: the different domains of the quinol binding pocket, and their role in mechanism, and the binding of inhibitors*. Biochemistry **1999**; 38:15807-15826.
- [24] Crofts AR, Berry EA. *Structure and function of the cytochrome bc1 complex of mitochondria and photosynthetic bacteria*. Curr Opin Struct Biol **1998**; 8:501-509.
- [25] Crofts AR, Hong S, Zhang Z, Berry EA. *Physicochemical aspects of the movement of the Rieske iron sulfur protein during quinol oxidation by the bc1 complex from mitochondria and photosynthetic bacteria*. Biochemistry **1999**; 38:15827-15839.
- [26] Crofts AR, Hong SJ, Ugulava N, Barquera B, Gennis RB, Guergova-Kuras M, and Berry E. *Pathways for proton release during ubihydroquinone oxidation by the bc1 complex*. Proc Natl Acad Sci USA **1999**; 96:10021-10026.
- [27] Crofts AR, Wang Z. *How rapid are the internal reactions of the UQH₂:cyt c₂ oxidoreductase?* Photosynth Res **1989**; 22:69-87.
- [28] Darrouzet E, Valkova-Valchanova M, Moser CC, Dutton PL, Daldal F. *Uncovering the [2Fe2S] domain movement in cytochrome bc1 and its implications for energy conversion*. Proc Natl Acad Sci USA **2000**; 97:4567-4572.
- [29] Dolder M, Walz T, Hefti A, Engel A. *Human erythrocyte band 3. Solubilization and reconstitution into two-dimensional crystals*. J Mol Biol **1993**; 231:119-132.
- [30] Dölle F. Dissertation, **1998**. Institut für Biophysik, JWG-Universität Frankfurt am Main.
- [31] Dorst HJ, Schubert D. *Self-association of band 3-protein from human erythrocyte membranes in aqueous solutions*. Hoppe Seylers Z Physiol Chem **1979**; 360:1605-1618.
- [32] Drickamer LK. *Orientation of the band 3 polypeptide from human erythrocyte membranes. Identification of NH₂-terminal sequence and site of carbohydrate attachment*. J Biol Chem **1978**; 253:7242-7248.
- [33] Durchschlag H, Zipper P. *Calculation of the partial volume of organic compounds and polymers*. Progr Colloid Polym Sci **1994**; 94:20-39.
- [34] Durchschlag H. In: *Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology* (Hrsg: Hinz H-J). Berlin/ Heidelberg/ New York/ Tokyo: Springer-Verlag, **1986**; 45-128.

-
- [35] Edelstein SJ, Schachman HK. *The simultaneous determination of partial specific volumes and molecular weights with microgram quantities*. J Biol Chem **1967**; 242:306-311.
- [36] Ehrhardt L. Dissertation, **1997**. Institut für Biophysik, JWG-Universität Frankfurt am Main.
- [37] Ernst M. Diplomarbeit, **1995**. Institut für Biophysik, JWG-Universität Frankfurt am Main.
- [38] Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF. *Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane*. Biochemistry **1971**; 10:2606-2617.
- [39] Friesen RH, Knol J, Poolman B. *Quaternary structure of the lactose transport protein of Streptococcus thermophilus in the detergent-solubilized and membrane-reconstituted state*. J Biol Chem **2000**; 275:33527-33535.
- [40] Fröhlich O, Gunn RB. *Erythrocyte anion transport: the kinetics of a single-site obligatory exchange system*. Biochim Biophys Acta **1986**; 864:169-194.
- [41] Fujita H. *Foundations of Ultracentrifugal Analysis*. New York: John Wiley and Sons, **1975**.
- [42] Gekko K, Morikawa T. *Preferential hydration of bovine serum albumin in polyhydric alcohol-water mixtures*. J Biochem **1981**; 90:39-50.
- [43] Gekko K, Timasheff SN. *Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures*. Biochemistry **1981**; 20:4667-4676.
- [44] Gekko K, Timasheff SN. *Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol*. Biochemistry **1981**; 20:4677-4686.
- [45] Gennis RB, Barquera B, Hacker B, van Doren SR, Arnaud S, Crofts AR, Davidson E, Gray KA, Daldal F. *The bc1 complexes of Rhodobacter sphaeroides and Rhodobacter capsulatus*. J Bioenerg Biomembr **1993**; 25:195-209.
- [46] Gennis RB. *Biomembranes: Molecular Structure and Function*. New York: Springer-Verlag, **1989**.
- [47] Goldberg RJ. *Sedimentation in the ultracentrifuge*. J Phys Chem **1953**; 57:194-202.
- [48] Groves JD, Tanner MJ. *Glycophorin A facilitates the expression of human band 3-mediated anion transport in Xenopus oocytes*. J Biol Chem **1992**; 267:22163-22170.
- [49] Hayashi Y, Matsui H, Takagi T. *Membrane protein molecular weight determined by low-angle laser light-scattering photometry coupled with high-performance gel chromatography*. Methods Enzymol **1989**; 172:514-528.
- [50] Helenius A, McCaslin DR, Fries E, Tanford C. *Properties of detergents*. Methods Enzymol **1979**; 56:734-749.
- [51] Helenius A, Simons K. *Solubilization of membranes by detergents*. Biochim Biophys Acta **1975**; 415:29-79.
- [52] Hendler RW, Pardhasaradhi K, Reynafarje B, Ludwig B. *Comparison of energy-transducing capabilities of the two- and three-subunit cytochromes aa3 from Paracoccus denitrificans and the 13-subunit beef heart enzyme*. Biophys J **1991**; 60:415-423.

- [53] Hendriks J, Warne A, Gohlke U, Haltia T, Ludovici C, Lübber M, Saraste M. *The active site of the bacterial nitric oxide reductase is a dinuclear iron center.* Biochemistry **1998**; 37:13102-13109.
- [54] Higashi T, Richards CS, Uyeda K. *The interaction of phosphofructokinase with erythrocyte membranes.* J Biol Chem **1979**; 254:9542-9550.
- [55] Hong S, Ugulava N, Guergova-Kuras M, Crofts AR. *The energy landscape for ubihydroquinone oxidation at the Qo site of the bc1 complex in Rhodobacter sphaeroides.* J Biol Chem **1999**; 274:33931-33944.
- [56] Huber E, Bäumert HG, Spatz-Kümbel G, Schubert D. *Associations between erythrocyte band 3 protein and aldolase in detergent solution. Determining their stoichiometry by analytical ultracentrifugation.* Eur J Biochem **1996**; 242:293-300.
- [57] Hunte C, Koepke J, Lange C, Rossmannith T, Michel H. *Structure at 2.3 angstrom resolution of the cytochrome bc1 complex from the yeast Saccharomyces cerevisiae co-crystallized with an antibody Fv fragment.* Structure Fold Des **2000**; 8:669-684.
- [58] Iwata S, Lee JW, Okada K, Lee JK, Iwata M, Rasmussen B, Link TA, Ramaswamy S, Jap BK. *Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex.* Science **1998**; 281:64-71.
- [59] Iwata S, Ostermeier C, Ludwig B, Michel H. *Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans.* Nature **1995**; 376:660-669.
- [60] Jarabak J, Seeds AE Jr, Talalay P. *Reversible cold inactivation of a 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase of human placenta: protective effect of glycerol.* Biochemistry **1966**; 5:1269-1279.
- [61] Jennings ML. *Kinetics and mechanism of anion transport in red blood cells.* Annu Rev Physiol **1985**; 47:519-533.
- [62] Jennings ML. *Oligomeric structure and the anion transport function of human erythrocyte band 3 protein.* J Membr Biol **1984**; 80:105-117.
- [63] Jennings ML. *Structure and function of the red blood cell anion transport protein.* Annu Rev Biophys Biophys Chem **1989**; 18:397-430.
- [64] Junemann S, Heathcote P, Rich PR. *On the mechanism of quinol oxidation in the bc1 complex.* J Biol Chem **1998**; 273:21603-21607.
- [65] Kessi J, Poirée JC, Wehrli E, Bachofen R, Semenza G, Hauser H. *Short-chain phosphatidylcholines as superior detergents in solubilizing membrane proteins and preserving biological activity.* Biochemistry **1994**; 33:10825-10836.
- [66] Korn M. Dissertation, **1999**. Institut für Biophysikalische Chemie und Biochemie, JWG-Universität Frankfurt am Main.
- [67] Kurowski B, Ludwig B. *The genes of the Paracoccus denitrificans bc1 complex.* J Biol Chem **1987**; 262:13805-13811.
- [68] Laemmli UK. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature **1970**; 227:680-685.
- [69] Lamm O. *Die Differentialgleichung der Ultrazentrifugierung.* Ark Mat Astr Fys **1929**; 21b:1-4.
- [70] Lee JC, Timasheff SN. *The stabilization of proteins by sucrose.* J Biol Chem **1981**; 256:7193-7201.

-
- [71] Lindenthal S, Schubert D. *Monomeric erythrocyte band 3 protein transports anions*. Proc Natl Acad Sci USA **1991**; 88:6540-6544.
- [72] Link TA. *The role of the 'Rieske' iron sulfur protein in the hydroquinone oxidation (Q(P)) site of the cytochrome bc1 complex. The 'proton-gated affinity change' mechanism*. FEBS Lett **1997**; 412:257-264.
- [73] Low PS, Rathinavelu P, Harrison ML. *Regulation of glycolysis via reversible enzyme binding to the membrane protein, band 3*. J Biol Chem **1993**; 268:14627-14631.
- [74] Low PS. *Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: center of erythrocyte membrane-peripheral protein interactions*. Biochim Biophys Acta **1986**; 864:145-167.
- [75] Ludwig B, Grabo M, Gregor I, Lustig A, Regenass M, Rosenbusch JP. *Solubilized cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans is a monomer*. J Biol Chem **1982**; 257:5576-5578.
- [76] Lukacovic MF, Feinstein MB, Sha'afi RI, Perrie S. *Purification of stabilized band 3 protein of the human erythrocyte membrane and its reconstitution into liposomes*. Biochemistry **1981**; 20:3145-3151.
- [77] Lustig A, Engel A, Tsiotis G, Landau EM, Baschong W. *Molecular weight determination of membrane proteins by sedimentation equilibrium at the sucrose or nycodenz-adjusted density of the hydrated detergent micelle*. Biochim Biophys Acta **2000**; 1464:199-206.
- [78] Lux SE, John KM, Kopito RR, Lodish HF. *Cloning and characterization of band 3, the human erythrocyte anion-exchange protein (AE1)*. Proc Natl Acad Sci USA **1989**; 86:9089-9093.
- [79] Matsuno-Yagi A, Hatefi Y. *Ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase. Effects of inhibitors on reverse electron transfer from the iron-sulfur protein to cytochrome b*. J Biol Chem **1999**; 274:9283-9288.
- [80] Mayer G, Anderka O, Ludwig B, Schubert D. *The state of association of the cytochrome bc1 complex from Paracoccus denitrificans in solutions of dodecyl maltoside*. Progr Colloid Polym Sci **2002**; 119:77-83.
- [81] Mayer G, Ludwig B, Müller H-W, van den Broek JA, Friesen RH, Schubert D. *Studying membrane proteins in detergent solution by analytical ultracentrifugation: different methods for density matching*. Progr Colloid Polym Sci **1999**; 113:176-181.
- [82] Mayer G. Diplomarbeit, **1996**. Institut für Biophysik, JWG-Universität Frankfurt am Main.
- [83] Meyburg S. Diplomarbeit, **2000**. Institut für Biophysik, JWG-Universität Frankfurt am Main.
- [84] Michaely P, Bennett V. *The ANK repeats of erythrocyte ankyrin form two distinct but cooperative binding sites for the erythrocyte anion exchanger*. J Biol Chem **1995**; 270:22050-22057.
- [85] Møller JV, le Maire M. *Detergent binding as a measure of hydrophobic surface area of integral membrane proteins*. J Biol Chem **1993**; 268:18659-18672.
- [86] Montoya G, te Kaat K, Rodgers S, Nitschke W, Sinning I. *The cytochrome bc1 complex from Rhodovulum sulfidophilum is a dimer with six quinones per monomer and an additional 6-kDa component*. Eur J Biochem **1999**; 259:709-718.

-
- [87] Mulzer K, Petrasch P, Kampmann L, Schubert D. *Studies on the stoichiometrie of the band 3/ankyrin association in human erythrocyte membranes*. Stud Biophys **1989**; 134:17-22.
- [88] Neugebauer JM. *Detergents: an overview*. Methods Enzymol **1990**; 182:239-253.
- [89] Nozaki Y, Schechter NM, Reynolds JA, Tanford C. *Use of gel chromatography for the determination of the Stokes radii of proteins in the presence and absence of detergents. A reexamination*. Biochemistry **1976**; 15:3884-3890.
- [90] Pappert G, Schubert D. *The state of association of band 3 protein of the human erythrocyte membrane in solutions of nonionic detergents*. Biochim Biophys Acta **1983**; 730:32-40.
- [91] Passow H. *Molecular aspects of band 3 protein-mediated anion transport across the red blood cell membrane*. Rev Physiol Biochem Pharmacol **1986**; 103:61-203.
- [92] Peters LL, Shivdasani RA, Liu SC, Hanspal M, John KM, Gonzalez JM, Brugnara C, Gwynn B, Mohandas N, Alper SL, Orkin SH, Lux SE. *Anion exchanger 1 (band 3) is required to prevent erythrocyte membrane surface loss but not to form the membrane skeleton*. Cell **1996**; 86:917-927.
- [93] Pinder JC, Pekrun A, Maggs AM, Brain AP, Gratzer WB. *Association state of human red blood cell band 3 and its interaction with ankyrin*. Blood **1995**; 85:2951-2961.
- [94] Raitio M, Jalli T, Saraste M. *Isolation and analysis of the genes for cytochrome c oxidase in Paracoccus denitrificans*. EMBO J **1987**; 6:2825-2833.
- [95] Raitio M, Pispä JM, Metso T, Saraste M. *Are there isoenzymes of cytochrome c oxidase in Paracoccus denitrificans?* FEBS Lett **1990**; 261:431-435.
- [96] Ralston G. *Introduction to Analytical Ultracentrifugation*. Fullerton, CA: Beckman Instruments, **1993**.
- [97] Reithmeier RA. *The erythrocyte anion transporter (band 3)*. Curr Opin Struct Biol **1993**; 3:515-523.
- [98] Rettig MP, Orendorff CJ, Campanella E, Low PS. *Effect of pH on the self-association of erythrocyte band 3 in situ*. Biochim Biophys Acta **2001**; 1515:72-81.
- [99] Reynolds JA, McCaslin DR. *Determination of protein molecular weight in complexes with detergent without knowledge of binding*. Methods Enzymol **1985**; 117:41-53.
- [100] Reynolds JA, Tanford C. *Determination of molecular weight of the protein moiety in protein-detergent complexes without direct knowledge of detergent binding*. Proc Natl Acad Sci USA **1976**; 73:4467-4470.
- [101] Ribeiro ML, Alloisio N, Almeida H, Gomes C, Texier P, Lemos C, Mimoso G, Morle L, Bey-Cabet F, Rudigoz RC, Delaunay J, Tamagnini G. *Severe hereditary spherocytosis and distal renal tubular acidosis associated with the total absence of band 3*. Blood **2000**; 96:1602-1604.
- [102] Rieske JS. *Experimental observations on the structure and function of mitochondrial complex III that are unresolved by the protonmotive ubiquinone-cycle hypothesis*. J Bioenerg Biomembr **1986**; 18:235-257.
- [103] Salhany JM, Cordes KA, Sloan RL. *Mechanism of band 3 dimer dissociation during incubation of erythrocyte membranes at 37 degrees C*. Biochem J **2000**; 345:33-41.

- [104] Salhany JM, Sloan RL. *Direct evidence for modulation of porter quaternary structure by transport site ligands*. Biochem Biophys Res Commun **1989**; 159:1337-1344.
- [105] Salhany JM. *Erythrocyte Band 3 Protein*. Boca Raton, FL: CRC Press, **1990**.
- [106] Sami M, Malik S, Watts A. *Structural stability of the erythrocyte anion transporter, band 3, in native membranes and in detergent micelles*. Biochim Biophys Acta **1992**; 1105:148-154.
- [107] Schachman HK. *Ultracentrifugation in Biochemistry*. New York: Academic Press, **1959**.
- [108] Schägger H, von Jagow G. *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal Biochem **1987**; 166:368-379.
- [109] Scheuring U, Kollwe K, Haase W, Schubert D. *A new method for the reconstitution of the anion transport system of the human erythrocyte membrane*. J Membr Biol **1986**; 90:123-135.
- [110] Scheuring U. Dissertation, **1987**. JWG-Universität Frankfurt am Main.
- [111] Schopfer LM, Salhany JM. *Factors determining the conformation and quaternary structure of isolated human erythrocyte band 3 in detergent solution*. Biochemistry **1992**; 31:12610-12617.
- [112] Schröter T, Hatzfeld OM, Gemeinhardt S, Korn M, Friedrich T, Ludwig B, Link TA. *Mutational analysis of residues forming hydrogen bonds in the Rieske [2Fe-2S] cluster of the cytochrome bc1 complex in Paracoccus denitrificans*. Eur J Biochem **1998**; 255:100-106.
- [113] Schubert D, Boss K, Dorst HJ, Flossdorf J, Pappert G. *The nature of the stable noncovalent dimers of band 3 protein from erythrocyte membranes in solutions of Triton X-100*. FEBS Lett **1983**; 163:81-84.
- [114] Schubert D, Boss K. *Analytical ultracentrifugation of proteins in solutions of Triton X-100 using absorption optics*. Z Naturforsch **1985**; 40c:908-911.
- [115] Schubert D, Huber E, Lindenthal S, Mulzer K, Schuck P. *The relationships between the oligomeric structure and the functions of human erythrocyte band 3 protein: the functional unit for the binding of ankyrin, hemoglobin and aldolase and for anion transport*. Progr Cell Research **1992**; 2:209-217.
- [116] Schubert D, Poensgen J, Werner G. *Association of protein fractions and lipids from human erythrocyte membranes. I. Studies on a strongly bound protein fraction*. Hoppe Seylers Z Physiol Chem **1972**; 353:1034-1042.
- [117] Schubert D, Schuck P. *Analytical ultracentrifugation as a tool for studying membrane proteins*. Progr Colloid Polym Sci **1991**; 86:12-22.
- [118] Schubert D, Tziatzios C, van den Broek JA, Schuck P, Germeroth L, Michel H. *Determination of the molar mass of pigment-containing complexes of intrinsic membrane proteins: problems, solutions and application to the light-harvesting complex B800/820 of Rhodospirillum rubrum*. Progr Colloid Polym Sci **1994**; 94:14-19.
- [119] Schubert D, van den Broek JA, Sell B, Durchschlag H, Mächtle W, Schubert US, Lehn J-M. *Analytical ultracentrifugation as a tool in supramolecular chemistry: a*

- feasibility study using a metal coordination array.* Progr Colloid Polym Sci **1997**; 107:166-171.
- [120] Schuck P, Legrum B, Passow H, Schubert D. *The influence of two anion-transport inhibitors, 4,4'-diisothiocyanatodihydrostilbene-2,2'-disulfonate and 4,4'-dibenzoylstilbene-2,2'-disulfonate, on the self-association of erythrocyte band 3 protein.* Eur J Biochem **1995**; 230:806-812.
- [121] Schuck P, Perugini MA, Gonzales NR, Howlett GJ, Schubert D. *Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems.* Biophys J **2002**; 82:1096-1111.
- [122] Schuck P, Rossmanith P. *Determination of the sedimentation coefficient distribution $g^*(s)$ by least-squares boundary modeling.* Biopolymers **2000**; 54:328-341.
- [123] Schuck P, Schubert D. *Band 3-hemoglobin associations.* The band 3 tetramer is the oxyhemoglobin binding site. FEBS Lett **1991**; 293:81-84.
- [124] Schuck P. Dissertation, **1994**. Institut für Biophysik, JWG-Universität Frankfurt am Main.
- [125] Schuck P. *Sedimentation analysis of noninteracting and self-associating solutes using numerical solutions to the Lamm equation.* Biophys J **1998**; 75:1503-1512.
- [126] Schuck P. *Simultaneous radial and wavelength analysis with the Optima XL-A analytical ultracentrifuge.* Progr Colloid Polym Sci **1994**; 94:1-13.
- [127] Schuck P. *Size distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling.* Biophys J **2000**; 78:1606-1619.
- [128] Singer SJ, Nicolson GL. *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.* Science **1972**; 175:720-731.
- [129] Sone N, Takagi T. *Monomer-dimer structure of cytochrome-c oxidase and cytochrome bc1 complex from the thermophilic bacterium PS3.* Biochim Biophys Acta **1990**; 1020:207-212.
- [130] Stafford III WF. *Boundary analysis in sedimentation transport experiments: a procedure for obtaining sedimentation coefficient distributions using the time derivative of the concentration profile.* Anal Biochem **1992**; 203:295-301.
- [131] Steck TL. *The band 3 protein of the human red cell membrane: a review.* J Supramol Struct **1978**; 8:311-324.
- [132] Steck TL. *The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review.* J Cell Biol **1974**; 62:1-19.
- [133] Steinrücke P, Steffens GC, Panskus G, Buse G, Ludwig B. *Subunit II of cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans. DNA sequence, gene expression and the protein.* Eur J Biochem **1987**; 167:431-439.
- [134] Stryer L. *Biochemistry*, 4th edition. New York: WH Freeman, **1995**.
- [135] Studier FW. *Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels.* J Mol Biol **1973**; 79:237-248.
- [136] Suarez MD, Revzin A, Narlock R, Kempner ES, Thompson DA, Ferguson-Miller S. *The functional and physical form of mammalian cytochrome c oxidase determined by gel filtration, radiation inactivation, and sedimentation equilibrium analysis.* J Biol Chem **1984**; 259:13791-13799.

- [137] Switzer III RC, Merrill CR, Shifrin S. *A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels*. Anal Biochem **1979**; 98:231-237.
- [138] Tanford C, Reynolds JA. *Characterization of membrane proteins in detergent solutions*. Biochim Biophys Acta **1976**; 457:133-170.
- [139] Tanford C. *The Hydrophobic Effect*. New York: John Wiley and Sons, **1973**.
- [140] Tanner MJ, Martin PG, High S. *The complete amino acid sequence of the human erythrocyte membrane anion-transport protein deduced from the cDNA sequence*. Biochem J **1988**; 256:703-712.
- [141] Tanner MJ. *The structure and function of band 3 (AE1): recent developments (review)*. Mol Membr Biol **1997**; 14:155-165.
- [142] Taylor AM, Boulter J, Harding SE, Cölfen H, Watts A. *Hydrodynamic properties of human erythrocyte band 3 solubilized in reduced Triton X-100*. Biophys J **1999**; 76:2043-2055.
- [143] Thevenin BJ, Low PS. *Kinetics and regulation of the ankyrin-band 3 interaction of the human red blood cell membrane*. J Biol Chem **1990**; 265:16166-16172.
- [144] Timasheff SN, Lee JC, Pittz EP, Tweedy N. *The interaction of tubulin and other proteins with structure-stabilizing solvents*. J Colloid Interface Sci **1976**; 55:658-663.
- [145] Tribet C, Audebert R, Popot JL. *Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions*. Proc Natl Acad Sci USA **1996**; 93:15047-15050.
- [146] Trumpower BL, Gennis RB. *Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation*. Annu Rev Biochem **1994**; 63:675-716.
- [147] Trumpower BL. *The three-subunit cytochrome bc1 complex of Paracoccus denitrificans. Its physiological function, structure, and mechanism of electron transfer and energy transduction*. J Bioenerg Biomembr **1991**; 23:241-255.
- [148] Tsuji T, Irimura T, Osawa T. *The carbohydrate moiety of band-3 glycoprotein of human erythrocyte membranes*. Biochem J **1980**; 187:677-686.
- [149] Turrini F, Arese P, Yuan J, Low PS. *Clustering of integral membrane proteins of the human erythrocyte membrane stimulates autologous IgG binding, complement deposition, and phagocytosis*. J Biol Chem **1991**; 266:23611-23617.
- [150] Tziatzios C, Schuck P, Schubert D, Tsiotis G. *The molar mass of an active photosystem I complex from the cyanobacterium Synechococcus PCC 7002*. Z Naturforsch **1994**; 49c:220-222.
- [151] Tziatzios C. Dissertation, **1998**. Institut für Biophysik, JWG-Universität Frankfurt am Main.
- [152] van Holde KE, Weischet WO. *Boundary analysis of sedimentation-velocity experiments with monodisperse and paucidisperse solutes*. Biopolymers **1978**; 17:1387-1403.
- [153] van Spanning RJ, Wansell CW, Harms N, Oltmann LF, Stouthamer AH. *Mutagenesis of the gene encoding cytochrome c550 of Paracoccus denitrificans and analysis of the resultant physiological effects*. J Bacteriol **1990**; 172:986-996.

- [154] Vince JW, Reithmeier RA. *Carbonic anhydrase II binds to the carboxyl terminus of human band 3, the erythrocyte Cl⁻/HCO₃⁻-exchanger*. J Biol Chem **1998**; 273:28430-28437.
- [155] Vince JW, Sarabia VE, Reithmeier RA. *Self-association of Band 3, the human erythrocyte anion exchanger, in detergent solution*. Biochim Biophys Acta **1997**; 1326:295-306.
- [156] Viner RI, Ferrington DA, Aced GI, Miller-Schlyer M, Bigelow DJ, Schöneich C. *In vivo aging of rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. Chemical analysis and quantitative simulation by exposure to low levels of peroxy radicals*. Biochim Biophys Acta **1997**; 1329:321-335.
- [157] Voet D, Voet JG. *Biochemie*. Weinheim/ New York/ Basel/ Cambridge: Verlag Chemie, **1992**.
- [158] Vogel V, Langer K, Balthasar S, Schuck P, Maechtle W, Haase W, van den Broek JA, Tziatzios C, Schubert D. *Characterization of serum albumin nanoparticles by sedimentation velocity analysis and electron microscopy*. Progr Colloid Polym Sci **2002**; 119:31-36.
- [159] von Jagow G, Schagger H. (Hrsg) *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*. San Diego: Academic Press, **1994**.
- [160] von Rückmann B, Jöns T, Dölle F, Drenckhahn D, Schubert D. *Cytoskeleton-membrane connections in the human erythrocyte membrane: Band 4.1 binds to tetrameric band 3 protein*. Biochim Biophys Acta **1997**; 1325:226-234.
- [161] von Rückmann B, Schubert D. *The complex of band 3 protein of the human erythrocyte membrane and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: stoichiometry and competition by aldolase*. Biochim Biophys Acta **2002**; 1559:43-55.
- [162] Wang DN, Kühlbrandt W, Sarabia VE, Reithmeier RA. *Two-dimensional structure of the membrane domain of human band 3, the anion transport protein of the erythrocyte membrane*. EMBO J **1993**; 12:2233-2239.
- [163] Wang DN, Sarabia VE, Reithmeier RA, Kühlbrandt W. *Three-dimensional map of the dimeric membrane domain of the human erythrocyte anion exchanger, Band 3*. EMBO J **1994**; 13:3230-3235.
- [164] Wang DN. *Band 3 protein: structure, flexibility and function*. FEBS Lett **1994**; 346:26-31.
- [165] Warren L. *The thiobarbituric acid assay of sialic acids*. J Biol Chem **1959**; 234:1971-1975.
- [166] Willardson BM, Thevenin BJ, Harrison ML, Kuster WM, Benson MD, Low PS. *Localization of the ankyrin-binding site on erythrocyte membrane protein, band 3*. J Biol Chem **1989**; 264:15893-15899.
- [167] Witt H, Ludwig B. *Isolation, analysis, and deletion of the gene coding for subunit IV of cytochrome c oxidase in Paracoccus denitrificans*. J Biol Chem **1997**; 272:5514-5517.
- [168] Wong P. *The state of association of Band 3 of the human erythrocyte membrane: evidence of a hexamer*. Biochim Biophys Acta **1993**; 1151:21-27.

-
- [169] Xia D, Kim H, Yu CA, Yu L, Kachurin A, Zhang L, Deisenhofer J. *A novel electron transfer mechanism suggested by crystallographic studies of mitochondrial cytochrome bc1 complex*. Biochem Cell Biol **1998**; 76:673-679.
- [170] Xia D, Yu C-A, Kim H, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L, Deisenhofer J. *Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria*. Science **1997**; 277:60-66.
- [171] Yang XH, Trumpower BL. *Protonmotive Q cycle pathway of electron transfer and energy transduction in the three-subunit ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex of Paracoccus denitrificans*. J Biol Chem **1988**; 263:11962-11970.
- [172] Yang XH, Trumpower BL. *Purification of a three-subunit ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex from Paracoccus denitrificans*. J Biol Chem **1986**; 261:12282-12289.
- [173] Yu J, Steck TL. *Associations of band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane*. J Biol Chem **1975**; 250:9176-9184.
- [174] Zhang D, Kiyatkin A, Bolin JT, Low PS. *Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3*. Blood **2000**; 96:2925-2933.
- [175] Zhang Z, Huang L, Shulmeister VM, Chi YI, Kim KK, Hung LW, Crofts AR, Berry EA, Kim SH. *Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1*. Nature **1998**; 392:677-684.
- [176] Zulauf M, Fürstenberger U, Grabo M, Jäggi P, Regenass M, Rosenbusch JP. *Critical micellar concentrations of detergents*. Methods Enzymol **1989**; 172:528-538.

Danksagung:

Bei all denen, die mir beim Zustandekommen dieser Arbeit geholfen haben, möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dieter Schubert, der mich während aller Phasen der Arbeit mit seinem wissenschaftlichen Rat, grundlegenden Anregungen und Diskussionen unterstützt hat.

Ein beträchtlicher Teil dieser Arbeit beruht auf der ausgezeichneten Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Ludwig. Ein großer Dank daher an Oliver „Ole“ Anderka für die Arbeit am bc_1 -Komplex und die Präparation der Cytochrom *c*-Oxidase, an Hans-Werner Müller für die Präparation der Cytochrom *c*-Oxidase und an Prof. Dr. Bernd Ludwig für seine Unterstützung.

Einen ganz herzlichen Dank richte ich an Mimi van den Broek und an Dr. Christos Tziatzios, zum einen für die Messungen, die sie für mich durchgeführt haben, zum anderen dafür, daß sie mich sowohl fachlich als auch als Freunde während meiner Tätigkeit begleitet haben.

Ebenso herzlichen Dank an Gülöz Yurt für ihre vielfältige Unterstützung.

Vielen Dank an Sven Meyburg für seine Messungen und für die freundschaftliche Zusammenarbeit, ebenso an Markus Bleuel, Dr. Bogdan von Rückmann, Dr. Vitali Vogel, Dr. Lutz Ehrhardt, Dr. Frank Dölle, Dr. Caroline Wenzel und Bernd Sell.

Danken möchte ich Dr. Peter Schuck dafür, daß er nicht nur seine Auswerteprogramme zur Verfügung stellte, sondern auch jederzeit für Erläuterungen zur Verfügung stand.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Helmut Durchschlag für die Berechnung des partialspezifischen Volumens von Häm-Gruppen, bei Dr. Horst Ruf (dynamische Lichtstreuung) und Dr. Thomas Russ (MALDI) für ihre Messungen an Detergenzien, bei Prof. Dr. Ulrich Schubert für die Reinigung von D₂O sowie bei Dr. Petra Hellwig und Michaela Ritter für ihre Informationen zur Cytochrom *c*-Oxidase bzw. zum bc_1 -Komplex.

Vielen Dank an Oliver Klein und an Ernst Winter für ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft.

Vielen Dank an Prof. Dr. Werner Mäntele und an Dr. Eberhard Dietz für so manchen guten Rat.

Nicht zuletzt sei meiner Familie, die mir den Weg bis hierher ermöglichte, und meinen Freunden, die mir auf vielerlei Weise geholfen haben, herzlichst gedankt.

Lebenslauf:

Name	Gottfried Mayer
Geburtsdatum	13.02.1966
Geburtsort	Passau
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Gottfried Mayer, Geschäftsführer Lidwina Mayer, kaufm. Angestellte
Familienstand	ledig
Zivildienst	04.11.1985 – 30.06.1987 im Krankenhaus Obernzell
Schulbildung	1972 – 1976 Volksschule Obernzell 1976 – 1985 Gymnasium Leopoldinum Passau 28.06.1985 Allgemeine Hochschulreife
Studium	seit SS 1987 immatrikuliert an der JWG-Universität Frankfurt/M. Studium der Pharmazie und Physik 24.10.1991 Vordiplom Physik 18.03.1996 Diplom Physik Diplomarbeit bei Prof. Dr. D. Schubert am Institut für Biophysik Thema: „ <i>Ultrazentrifugen-Untersuchungen an den Erythrozytenmembran-Proteinen Bande 3 und Bande 2.1</i> “
Wissenschaftliche Tätigkeit	01.05.1996 – 30.04.2001 und ab 01.06.2002 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Biophysik der JWG-Universität
Veröffentlichungen	Mayer G, Ludwig B, Müller H-W, van den Broek JA, Friesen RH, Schubert D. <i>Studying membrane proteins in detergent solution by analytical ultracentrifugation: different methods for density matching</i> . Progr Colloid Polym Sci 1999; 113:176-181. Mayer G, Anderka O, Ludwig B, Schubert D. <i>The state of association of the cytochrome bc1 complex from Paracoccus denitrificans in solutions of dodecyl maltoside</i> . Progr Colloid Polym Sci 2002; 119:77-83. Blaheta RA, Hundemer M, Mayer G, Vogel JU, Kornhuber B, Cinatl J, Markus BH, Driever PH, Cinatl J Jr. <i>Expression level of neural cell adhesion molecule (NCAM) inversely correlates with the ability of neuroblastoma cells to adhere to endothelium in vitro</i> . Cell Commun Adhes 2002; 9:131-147.
Aktive Tagungsteilnahmen	XI th International Symposium on Analytical Ultracentrifugation, Potsdam 1999 (Vortrag) XII th International Symposium on Analytical Ultracentrifugation, Duisburg 2001 (Poster)